

Elektrophysiologische Untersuchungen zur
funktionellen Bedeutung der N-Glykosilierung
des GABA-Transportproteins besonders in Bezug
auf die Kinetik der Natrium-Transporter-Interaktion

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Physik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Petrus Stephan Salonikidis
aus Masdjed-Soleyman / Iran

Frankfurt 2003
(DF1)

vom Fachbereich Physik der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:.....

Gutachter:.....

.....

Datum der Disputation:.....

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Wolfgang Schwarz angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

I. EINFÜHRUNG	1
I.A. Der GABA-Transporter GAT-1.....	1
I.A.1. Klassifizierung und gewebespezifische Verteilung.....	1
I.A.2. Struktur und funktionelle Stellen	2
I.A.3. Stöchiometrie und Funktionsweise des Transportzyklus	7
I.A.4. N-Glykosylierung.....	14
I.B. Vorarbeiten von G.Q. Cai über N-Glykosylierung am GAT-1.....	17
I.C. Fragestellung.....	18
 II. METHODEN	 20
II.A. Biologische Methoden.....	20
II.A.1. DNA-Konstrukt des mGAT1-Transporters und seiner N-Glykosylierungspunktmutanten	20
II.A.2. Verwandtes Zellsystem: CHO-Zelle	21
II.A.3. Kultivierung der CHO-Zellen	21
II.A.4. DNA-Transfektion der CHO-Zellen	23
II.A.4.a) Transfektionsprotokoll für das „SuperFect Transfection Reagent“ der Firma Qiagen.....	23
II.A.4.b) Transfektionsprotokoll für das „FuGENE 6, Transfection Reagent“ der Firma Roche.....	24
II.B. Das Patch-Clamp-Verfahren.....	25
II.B.1. Einleitung	25
II.B.2. Theorie der Spannungsklemme.....	26
II.B.3. Aufbau und Durchführung	29
II.B.3.a) Meßstand	29
II.B.3.b) Meßkammer.....	31
II.B.3.c) Elektroden und ihre Aufgaben.....	32
II.B.3.d) Badelektrode	33
II.B.3.e) Patch-Elektrode.....	35
II.B.3.f) Herstellung der Patch-Pipette.....	36
II.B.3.g) Versuchsdurchführung.....	38
II.B.3.h) Verwendete Konfigurationen des Patch	39
II.B.3.i) Lösungswechsel.....	41
II.C. Aufnahme und Analyse der Meßdaten.....	43
II.C.1. Aufnahme von Strömen	43
II.C.2. Auswertung der gemessenen Stromverläufe	45
II.C.2.a) Auswertung von Steady-State-Stromverläufen	46
II.C.2.b) Auswertung transienter Stromverläufe	47
 III. MATERIALIEN	 49
III.A. Lösungen	49
III.A.1. Lösungen für die Zellbehandlung.....	49
III.A.1.a) Kulturmedium	49
III.A.1.b) Calciumfreie Pufferlösung PBS.....	50
III.A.1.c) Versene-Lösung.....	50
III.A.1.d) DMSO-Lösung	51
III.A.2. Rezepturen der bei den Experimenten verwandte Lösungen.....	51
III.A.2.a) Wasseraufbereitung	51
III.A.2.b) Rezepturen der Badlösung sowie der Lösungen der extrazellulären Natriumreihe.....	51
III.A.2.c) Rezeptur der Pipettenlösung	52
III.B. Chemikalien.....	53
III.C. Gerätschaften.....	53
III.C.1. Patch-Clamp-Meßstand	53
III.C.2. Zellkultur	54
III.D. Software.....	55
 IV. RESULTATE	 56

IV.A. Steady-State-Ströme	56
IV.A.1. GABA-induzierte Steady-State-Ströme des mGAT1	58
IV.A.2. GABA-induzierte Steady-State-Ströme des Wild-Typ mGAT1 sowie DGN und DDN im Vergleich	60
IV.B. Durch Potentialänderungen induzierte transiente Ströme des mGAT1 in Abwesenheit von GABA	63
IV.B.1. Vergleich von Zeitkonstanten transienter Ströme des mGAT1 sowie DGN und DDN	68
IV.C. Ladungsverschiebungen am Enzym des mGAT1 in Abwesenheit von GABA	69
IV.C.1. Vergleich der Ladungsverschiebungen vom Wild-Typ des mGAT1, sowie DGN und DDN	71
IV.C.2. Vergleich zwischen dem Wild-Typ des mGAT1, der Mutante DDN sowie DGN über Mittelpunktpotentiale der Ladungsverschiebung aus einer Funktionsanpassung nach Fermi	74
IV.C.3. Vergleich scheinbarer Valenz der Ladungsverschiebung aus einer Funktionsanpassung nach Fermi vom Wild-Typ des mGAT1 mit DDN sowie DGN	77
IV.C.4. Vergleich der in der Zellmembran exprimierten Zahl der Transportmoleküle des mGAT1	78
IV.D. Vergleich von natriumabhängigen Steady-State-Strömen pro Transportmolekül	80
IV.E. Vergleich potentialabhängiger Steady-State-Stromverläufe eines Transportermoleküls bei verschiedenen Natriumkonzentrationen	84
IV.F. Einfluß der dMM-Behandlung der Zellen auf Steady-State-Ströme des mGAT1	85
V. DISKUSSION	88
V.A. Einfluß der N-Glykosylierung auf die GAT-1-Expression	88
V.B. Einfluß der N-Glykosylierung auf Transportströme im elektrochemischen Gleichgewicht	89
V.B.1. Potentialabhängige normierte Verläufe	90
V.B.2. Stromamplituden und Transportraten	92
V.C. Einfluß auf transiente Ströme in Abwesenheit von GABA	94
V.C.1. Zeitkonstanten	94
V.C.2. Ladungsverschiebung	97
V.D. Abschluß und Ausblick	99
VI. ZUSAMMENFASSUNG	102
VII. ANHANG	104
VII.A. Wichtige Abkürzungen:	104
VII.B. Literaturverzeichnis	104
VII.C. Lebenslauf	109
VII.D. Danksagung	111

I. Einführung

I.A. Der GABA-Transporter GAT-1

I.A.1. Klassifizierung und gewebespezifische Verteilung

Unter phylogenetischem Gesichtspunkt lassen sich fünf Klassen von Aminosäuretransportern unterscheiden: Die γ -Aminobuttersäuretransporter (GABA-Transporter) sind dabei Mitglied der drittgrößten Klasse, nämlich derjenigen der Neurotransmittertransporter NTS (für engl. „neurotransmitter transporter superfamily“). Die Mitglieder dieser Klasse, zu denen weiterhin Membrantransporter für Prolin, Glycin und Betain gehören, besitzen eine gemeinsame Struktur mit vermutlich 12 transmembranen Helices. Aminosäuretransporter wurden in bereits komplett sequenzierten Genomen eukaryontischer Zellen von Hefen, Pflanzen und Tieren ausgemacht, wohingegen sich zeigte, daß die Klasse der NTS lediglich in Tieren vorkommt [Wipf *et al.* 2002]. Der erste geklonte und sequenzierte Vertreter der im Tier vorkommenden Aminosäuretransporter war der GABA-Transporter des menschlichen Hirns [Nelson *et al.* 1990].

Untersucht man Homologien innerhalb der Vertreter aller Neurotransmittertransporter (also nicht nur der Aminosäuretransporter), geht man von 4 übergeordneten Familien aus, wobei die GABA-Transporter zusammen mit den Dopamin-, Noradrenalin und Serotonin-Transportern in der Klasse der Natrium- und Chlorid-abhängigen Neurotransmittertransporter zu finden sind. Die Gemeinsamkeiten liegen auch hier in der Proteinstruktur, welche 12 hydrophobe (und somit möglicherweise transmembrane) Regionen aufweist, sowie in den 2 bis 4 übereinstimmenden N-Glykosilierungsstellen (welche sich in der großen extrazellulären Schleife zwischen der 3. und 4. angenommenen transmembranen Domäne befinden) [Uhl 1992].

Bei den Transportern für GABA unterscheidet man vier verschiedene Subtypen, nämlich GAT-1, GAT-2, GAT-3 und BGT-1. Die einzelnen Bezeichnungen der GABA-Transporter variieren in der Literatur stark; jedoch sind sie beispielsweise bei Palacín *et al.* [1998] sämtlich aufgelistet und zugeordnet. Für die hier vorliegende Arbeit wurde der Transporter GAT-1 (in der Lit. auch als GAT1 bezeichnet) aus der Spezies Maus gewonnen, welcher

erstmalig durch Liu *et al.* [1992] sequenziert wurde. Um auf die Herkunft von der Maus hinzuweisen, trägt der Transporter die Bezeichnung „mGAT1“.

Jeder der vier Transportersubtypen zeigt eine charakteristische Verteilung im Gehirn [Borden 1996], wobei GAT-1 in allen Teilen des Gehirns auszumachen ist [Mabjeesh *et al.* 1992]. Die Tatsache, daß die große und gegenüber den anderen GABA-Transportern unterschiedslose Verteilung mit der Verteilung von GABA im Gehirn korrespondiert, deutet auf die wichtige Rolle von GAT-1 in den GABAergen Synapsen hin [Jursky *et al.* 1994]. Neben dem Nachweis von GAT-1 in GABAergen präsynaptischen Neuronen, welche durch die Verteilung der mRNA der Glutaminsäure-Decarboxylase (einem GABA-Synthesenzym) charakterisiert werden, erscheint wohl auch der Nachweis von GAT-1 in nicht-GABAergen postsynaptischen Neuronen gelungen zu sein [Swan *et al.* 1994]. Zudem wurde GAT-1 in Gliazellen (Versorgerzellen der Neuronen) nachgewiesen und trägt hier höchstwahrscheinlich zur Regulation der extrazellulären GABA-Konzentration bei [Morara *et al.* 1996].

1.A.2. Struktur und funktionelle Stellen

Um das Molekulargewicht von GAT-1-Proteinen zu erhalten, reinigte man diese aus Rattenhirn auf und identifizierte sie mittels Antikörpern [Radian und Kanner 1985; Radian *et al.* 1986]. Die Proteine wurden in Bezug auf Natrium- und Chloridabhängigkeit, Elektrogenität, Affinität und Substrat-Efflux sowie –Austausch untersucht: Dabei zeigte sich, daß sie die gleichen Eigenschaften aufweisen, wie sie auch in synaptischen Plasmamembranvesikeln befindliche GAT-1-Transporter besitzen. Die aufgereinigten Proteine hatten ein scheinbares Molekulargewicht von 80kDa. Ebenfalls aus dem Rattenhirn konnte später ein komplementärer Desoxyribonukleinsäure(cDNA)-Klon isoliert werden, welcher jenen GAT-1-Transporter bzw. die funktionell relevanten Sequenzen kodiert [Guastella *et al.* 1990]. Mit der Nuklidsequenz ließ sich auf ein Transportprotein mit 599 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 67kDa schließen. Um die Annahme hinsichtlich des Molekulargewichts nachzuprüfen, wurde die aus dem cDNA-Klon retranskribierte messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) *in vitro* in GAT-1-Proteine transferiert. Mit Hilfe der Immunoprecipitationsmethode konnte ein Molekulargewicht von 67kDa bestimmt werden, wie es auch aus der Sequenz berechnet wurde. Da der GAT-1-Transporter ein Glykopolypeptid ist und im Falle des aufgereinigten Proteins im glykosilierten Zustand vorliegt, was jedoch nicht für das aus der cDNA-Sequenz berechnete Protein gilt, ist der Unterschied im Molekulargewicht zwischen 80kDa und 67kDa wahrscheinlich auf diesen

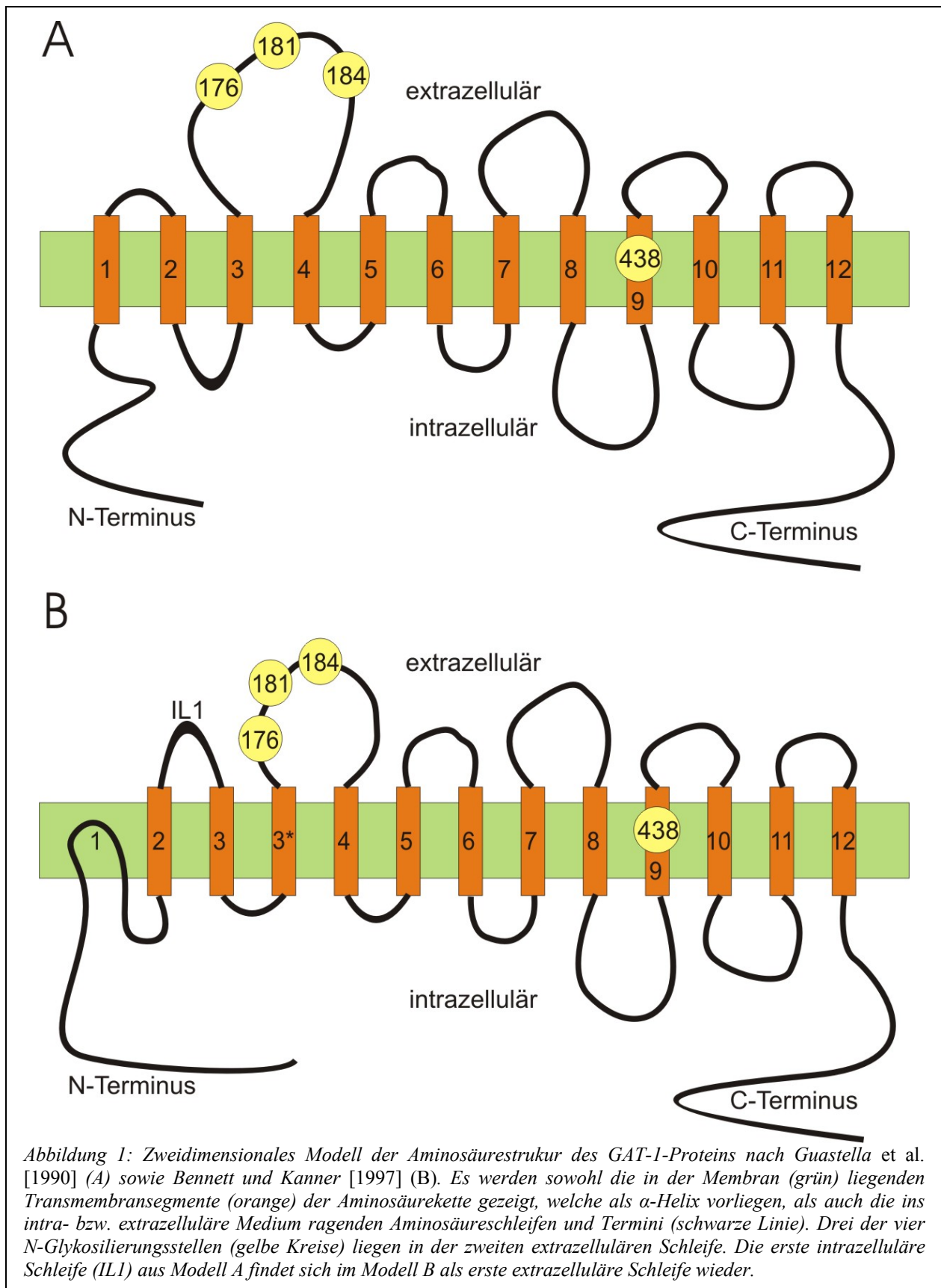
Umstand zurückzuführen. Die Behandlung mit dem Enzym Endoglykosidase, welches mannosereiche und komplexe Kohlenhydrate entfernt, führte nämlich bei den aufgereinigten GAT-1-Proteinen zu einer Reduzierung des Molekulargewichts auf 60kDa [Kanner *et al.* 1989].

Die Sequenz der von J. Guastella *et al.* geklonten cDNA weist 4 mögliche N-Glykosilierungsstellen (an den Positionen 176,181,184 sowie 438 der Aminosäurekette) und 7 mögliche Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C auf. Um die transmembranen Domänen des Proteins zu ermitteln, muß nach hydrophoben Bereichen gesucht werden. Hiervon können 11 bis 13 ausgemacht werden. Da sowohl das COOH-terminale Ende als auch das NH₂-terminale Ende des Proteins im Zytosol vermutet wird, ergibt sich eine Anzahl von 12 transmembranen Domänen. Jede Domäne besitzt die Struktur einer α -Helix, welche aus etwa 21 Gliedern besteht. Die gesamte Proteinstruktur ist in Abbildung 1 zweidimensional schematisch dargestellt. Ausgehend von dieser Annahme hinsichtlich der Struktur nach J. Guastella *et al.* gelangt man zu der Vorstellung, drei der vier N-Glykosilierungsstellen befänden sich in einer Schleife EL2 (für engl. „2nd extracell. loop“) der Aminosäurekette, welche zwischen der dritten und vierten transmembranen Domäne ins extrazelluläre Milieu hineinragt. Es handelt sich hierbei um die größte extrazelluläre Schleife des Proteins. Die vierte N-Glykosilierungsstelle ist extrazellulär nicht zugänglich, sondern befindet sich innerhalb der neunten möglichen transmembranen Domäne.

In einer weiteren Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß die drei N-Glykosilierungsstellen auf der großen extrazellulären Schleife des Proteins *in vivo* tatsächlich im glykosilierten Zustand vorliegen [Bennett und Kanner 1997]. Der Nachweis gelang mit Hilfe von Tunicamycin, einem N-Glykosilierungsinhibitor, sowie unter Verwendung von Mutanten des GAT-1, welche an den N-Glykosilierungsstellen mutiert waren.

Die Auffassung über die Beschaffenheit der Struktur hat sich seit der Arbeit von J. Guastella *et al.* bis dato immer wieder gewandelt, zumindest was die COOH-terminale Seite bis zu den 3 extrazellulären N-Glykosilierungsstellen betrifft. So konnten Bennett und Kanner zwar bestätigen, daß sich gemäß der von J. Guastella *et al.* vorgeschlagenen Struktur die Schleifen EL2, EL3 und EL6 auf extrazellulärer Seite befinden (für EL4 und EL5 ist dies höchstwahrscheinlich), die beiden terminalen Enden dagegen auf der intrazellulären Seite; allerdings deuteten die Experimente darauf hin, daß die erste Schleife intrazellulär vorliegen müsse. Zwangsläufig gäbe es demnach zwischen der dritten und vierten transmembranen Domäne noch eine weitere (3*). Die erste Domäne sollte nicht mehr als eine transmembrane vorliegen, sondern lediglich als eine von der intrazellulären Seite aus in die Membran

hineinragende. Strukturuntersuchungen auf hydrophobe Domänen bei Transportern der gleichen übergeordneten Familie wiesen darauf hin, daß die erste Domäne wahrscheinlich nicht als α -Helix vorliegt.



Bennett und Kanner schlugen auf Grund ihrer Untersuchungen die in Abbildung 1 schematisch dargestellte Struktur vor.

Spätere Arbeiten, die auf anderen Verfahren basierten, ergaben jedoch, daß sowohl die Schleife zwischen der ersten und zweiten als auch die Schleife zwischen der zweiten und dritten Domäne extrazellulär sein müssen und folglich die erste Domäne transmembran vorliegt und die zweite Domäne entweder von der extrazellulären Seite her in die Membran hineinragt oder gar nicht mit der Membran in Berührung kommt [Yu *et al.* 1998]. Im selben Jahr wurde eine Arbeit veröffentlicht, welche sich mit der Struktur des Serotonin-Transporters beschäftigte [Chen *et al.* 1998]. Da der Serotonin-Transporter genau wie der GABA-Transporter zu der Klasse der Natrium- und Chlorid-abhängigen Neurotransmittertransporter gehört (wie im vorherigen Kapitel erläutert) und innerhalb dieser Klasse eine große Homologie herrscht, sollten strukturelle Erkenntnisse hinsichtlich eines Transporters auf alle Transporter der gleichen Klasse übertragbar sein. Die genannte Arbeit konnte nun mit Aktivitätsmessungen an ausgesuchten Cystein- und Lysinstellen mit extrazellulären Reagenzien die von J. Guastella *et al.* vorgeschlagene Struktur bestätigen. Es bleibt abzuwarten, welches Strukturmodell sich letztlich durchsetzen wird.

Bei Untersuchungen an den terminalen Enden des GAT-1 zeigte sich, daß große Teile sowohl des COOH- als auch der NH₂-Endes keine funktionelle Bedeutung aufweisen [Mabjeesh und Kanner 1992]. Die Transportaktivität zeigte sich bei Mutanten, bei denen die dritte bis 41. bzw. 576. bis 599. Aminosäure fehlten, gegenüber dem Wild-Typ unverändert [Bendahan und Kanner 1993]. Mutationen kurz hinter diesen Domänen (in Richtung auf die Helices) jedoch bewirken Veränderungen im Transportverhalten: So führt beispielsweise eine Mutation an Arginin (44) zu einer Verminderung der Transportaktivität um 15%, was mit einer Veränderung in der Reorientierung des unbeladenen Transporters begründet wurde [Bennett *et al.* 2000].

Weiterhin drängt sich die Frage auf, ob nicht geladene Aminosäureglieder in den transmembranen Helices am Transport von geladenen Na⁺- und Cl⁻-Ionen sowie den GABA-Zwitterionen beteiligt sind. Mutationen der vier positiv geladenen Aminosäuren und der einen negativ geladenen ergaben, daß lediglich Arginin (69) in der ersten transmembranen Helix die Transportaktivität bedeutend beeinflusst [Pantanowitz *et al.* 1993]. Interessanterweise war dieser Effekt aber nicht hauptsächlich auf die Ladung dieser Aminosäure zurückzuführen, weshalb anzunehmen ist, daß geladene Stellen in den transmembranen Domänen mit ihrer Ladung keinen Einfluß auf den Transport nehmen.

Ebenfalls rückten aromatische Aminosäuren mit ihren π -Elektronen in den Fokus der Suche nach funktioneller Beeinflussung des Transports. Dabei stellte sich heraus, daß Tryptophane hauptsächlich an den Stellen 68 in der ersten Helix und 222 in der vierten Helix einen wesentlichen Einfluß auf die Transportaktivität ausüben [Kleinberger-Doron und Kanner 1994], wobei im besonderen an der Stelle 68 eine Änderung in der Natrium- und GABA-Affinität ausgemacht wurde [Mager *et al.* 1996]. Bei der aromatischen Aminosäure Tyrosin scheint die Stelle 140 in der dritten Helix eine Bedeutung für die Bindung und für den Transport von GABA zu haben [Bismuth *et al.* 1997].

Neben den terminalen Enden und den hydrophoben Transmembrandomänen wurden auch die hydrophilen Schleifen untersucht, welche die Transmembrandomänen miteinander verbinden. Da man den „konservierten“ Regionen der Aminosäureschleifen – also solchen Regionen, die ebenfalls in anderen Neurotransmittertransportern der selben Klasse vorkommen – mit großer Zuversicht eine funktionelle Bedeutung zuschrieb, richtete sich das Interesse auf die nicht „konservierten“ Regionen. Hier zeigte sich, daß die Funktion entscheidend von der Ausdehnung dieser Region, nicht so sehr indes von der Zusammensetzung der Aminosäuren abhing [Kanner *et al.* 1994]. Durch die entsprechende Länge der Schleifen, so vermutete man, sollten die Helices die richtige Position innerhalb der Proteinstruktur erhalten. Spätere Untersuchungen an den „konservierten“ Regionen zeigten dann den bereits vermuteten funktionellen Einfluß, wie z.B. für die Stelle 101, an welcher in der ersten intrazellulären Schleife die Aminosäure Glutamat sitzt: Mutationen dieser negativ geladenen Stelle führen zu einer drastischen Aktivitätsverringerung des Transports und zu einem Ausbleiben transientser Natriumströme (vgl. hierzu Kapitel II.C.2), die der GABA-Bindung vorausgehen [Keshet *et al.* 1995]. Man schloß hier auf eine Veränderung der Natriumbindung bzw. der mit der Bindung und der Ablösung von Substraten einhergehenden Konformationsänderung des Proteins. Durch Kreuzmutationen zwischen GAT-1 und den Transportern GAT-2, GAT-3 und GAT-4 fand man heraus, daß einige Aminosäureregionen in der vierten und sechsten extrazellulären Schleife für die GABA-Bindung mitverantwortlich sind. Auch Regionen in der fünften Schleife scheinen zumindest im Falle des GAT-3 an der GABA-Bindung mitbeteiligt zu sein. Tamura *et al.* [1995]. nehmen deshalb an, daß die vierte, fünfte und sechste extrazelluläre Schleife gemeinsam eine Bindungstasche für GABA bilden. Nach Mutation der Stelle 448 in der fünften extrazellulären Schleife ergab sich eine starke pH-Sensitivität des Transportprozesses [Forlani *et al.* 2001]. Es wurde darüber spekuliert, daß die fünfte Schleife eine Art Vorkammer bilden könne, welche das Natrium passieren muß, bevor es am Ladeverschiebungsvorgang teilnimmt.

I.A.3. Stöchiometrie und Funktionsweise des Transportzyklus

Untersuchungen, die das Verhältnis der mit GABA cotransportierten Ionen am GAT-1 in den Blick nahmen, wurden anfangs ohne Unterstützung elektrophysiologischer Methoden durchgeführt. An synaptischen Plasmamembran-Vesikeln konnte B.I. Kanner bereits 1978 nachweisen, daß für den GABA-Eintransport in diese Vesikel Chlorid oder kleine monovalente Ionen im äußeren Medium benötigt werden [Kanner 1978]. Eine spätere Arbeit von Kanner und Kifer [1981] legte die Vermutung nahe, daß der durch den GABA-Transporter katalysierte Einstrom von GABA mit dem von Na^+ - und Cl^- -Ionen gekoppelt war. Anhand stöchiometrischer Untersuchungen mit radioaktiv markiertem GABA ($[^3\text{H}]\text{GABA}$) an aus Ratten gewonnen Plasmamembran-Vesikeln konnten thermodynamische Analysen von Konzentrationsabhängigkeiten durchgeführt werden [Radian und Kanner 1983]. Daraus ergab sich die Annahme, pro transportiertem GABA werde $1,5 \pm 0,2 \text{ Na}^+$ sowie $0,47 \pm 0,02 \text{ Cl}^-$ in die Zelle transportiert. Eine spätere Arbeit maß die zeitgleiche Aufnahme von radioaktiv markiertem GABA, Natrium ($^{22}\text{Na}^+$) und Chlorid ($^{36}\text{Cl}^-$) in Proteoliposomen, in welchen teilaufgereinigte GAT-1-Proteine der Ratte rekonstituiert wurden [Keynan und Kanner 1988]. Man erhielt eine zumindest für Natrium (auf Grund der hohen Natriumhintergrundleitfähigkeit) recht ungenaue Stöchiometrie von $2,58 \pm 0,99 \text{ Na}^+ : 1,27 \pm 0,12 \text{ Cl}^- : 1 \text{ GABA}$. Trotz unterschiedlicher Ergebnisse der einzelnen Arbeiten und trotz des großen und sicherlich systembedingten Fehlers in den Werten wollten die Autoren als einfachsten Fall die Gemeinsamkeit einer $2 \text{ Na}^+ : 1 \text{ Cl}^- : 1 \text{ GABA}$ -Stöchiometrie für den GAT-1 erkennen. Unter der Voraussetzung, daß das Zwitterion GABA als elektrisch neutrales Substrat transportiert wird, bedeutete dies einen Nettoeinstrom von einer positive Einheitsladung (1 e^-) pro Transportzyklus. Eine der ersten elektrophysiologischen Arbeiten von Cammack *et al.* [1994], welche noch ein recht einfaches Transportmodell für GAT-1 zugrundelegte, ging von einer sich ändernden Stöchiometrie des GABA-Transporters aus, weil sich erstens der Transportstrom bei extrazellulärer GABA-Applikation nicht symmetrisch zum Stromverlauf bei intrazellulärer GABA-Applikation verhielt, obwohl die Coionenkonzentrationen intra- wie extrazellulär symmetrisch verteilt waren und weil zweitens extrazelluläres GABA neben Einwärtsströmen auch Auswärtsströme provozieren konnte. Im weiteren Verlauf jedoch konnten elektrophysiologische Arbeiten keinen Widerspruch zu der von Keynan und Kanner vorgeschlagenen Stöchiometrie erkennen. Diese wollten sogar Lu und Hilgemann [1999b] bestätigt wissen, indem sie elektrophysiologische Untersuchungen mit

schnellen Konzentrationssprüngen zum ersten Mal auf der intrazellulären Seite der Zellmembran durchführten, um so den Umkehrtransport vom GAT-1 näher zu untersuchen. Sie verglichen hierfür ihre Resultate mit dem Modell einer Hill-Kinetik. Sie machten zwar ein asymmetrisches Verhalten für die GABA-Affinität der intrazellulären gegenüber der extrazellulären Seite des Transporters aus; eine Stimulation eines Umkehrtransports des GAT-1 durch extrazelluläres GABA wie bei Cammack *et al.* konnte jedoch nicht beobachtet werden. Auch in anderen Punkten widersprachen die Ergebnisse denen von Cammack *et al.*, was von den Autoren auf die Verwendung eines unterschiedlichen Expressionssystems zurückgeführt wurde.

Eine relativ neue Arbeit läßt jedoch an der bisherigen Auffassung über die Stöchiometrie Zweifel aufkommen [Loo *et al.* 2000]. Diese Arbeit vergleicht zum erstem Mal direkt an jeweils der selben Zelle die Aufnahme von radioaktiv markiertem GABA mit der von ebenfalls radioaktiv markierten Coionen sowie die Abgabe von $^{36}\text{Cl}^-$. Die Zellen wurden dabei gleichzeitig elektrophysiologisch untersucht, und indem man den durch GAT-1 verursachten radioaktiven Ein- bzw. Ausstrom mit dem elektrischen GAT-1-Transportstrom normierte, konnte mit einem Fehler von $\pm 0,1$ zwar die Stöchiometrie von Keyan und Kanner für den Einstrom von GABA und der Coionen bestätigt werden, allerdings entdeckte man, daß für jedes hineintransportierte Cl^- im selben Zyklus ein weiteres Cl^- wieder hinaus transportiert wurde. Durch diesen Cl^-/Cl^- -Austausch ergab sich ein Nettoeinstrom von zwei positiven Einheitsladungen ($2 e^+$) pro Transportzyklus. Zudem zeigte sich, daß bei sehr negativen Potentialen ein Transport auch ohne extrazelluläres Cl^- vorkommt, und unter diesen Bedingungen folglich eine andere Stöchiometrie vorliegen muß. Mit Hilfe der bisher einmaligen Methodenkombination aus radioaktiven Uptake-Messungen und elektrophysiologischen Messungen am GAT-1 ist es Loo *et al.* gelungen, ein genaueres Bild von der Stöchiometrie zu zeichnen, als dies frühere Arbeiten zu leisten vermochten. Die gleiche Methodenkombination wandte im selben Jahr Eckstein-Ludwig *et al.* [2000] an, jedoch lediglich unter Verwendung von radioaktiv markiertem GABA. Eine Stöchiometrie von einem transportierten GABA pro Einheitsladung konnte auch in diesem Falle nicht bestätigt werden. Sogar die von Loo *et al.* angenommene Stöchiometrie von 1 GABA : $2 e^+$ war noch nicht ausreichend, denn es ergab sich ein nach bisheriger Stöchiometrieannahme um mindestens eine Größenordnung erhöhter elektrischer Strom. Im Gegensatz zu der Arbeit von Loo *et al.* wurden hier bei unterschiedlichen Potentialen gemessen, so daß das potentialabhängige Verhalten der elektrischen Ströme gegenüber den Einstömen radioaktiv markierten GABAs verglichen werden konnte. Man fand keine Übereinstimmung in

derartigen Abhängigkeiten und schloß daraus auf Grund der Art und Weise der Abhängigkeiten selbst auf eine zusätzliche, nicht durch die Stöchiometrie beschreibbare Leitfähigkeit.

Eine solche zusätzliche Eigenschaft des GAT-1, welche neben seiner durch die Stöchiometrie beschriebenen Transporteigenschaft hinzutritt, konnte bereits früher beobachtet werden. Bei GAT-1 exprimierten Zellen nämlich wies die Zellmembran gegenüber nicht-exprimierten Zellen eine zusätzliche Leitfähigkeit für Cs^+ - und Li^+ -Ionen auf [Cammack *et al.* 1994; Mager *et al.* 1996]. Bei den hierdurch verursachten Strömen handelte es sich um von GABA entkoppelte Ströme, welche die Idee eines kanalartigen Modus (channel-like mode) für den GAT-1 aufkommen ließen. Cammack und Schwartz suchten daraufhin mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden nach Einzelkanalereignissen in GAT-1 exprimierten Zellen und wollten solche bei Abwesenheit von GABA auch gesehen haben; bei GABA-Zugabe indes verschwanden diese [Cammack und Schwartz 1996]. Ein Auftreten dieser Phänomene wurde bei Anwesenheit von Cs^+ , Li^+ , aber auch von Na^+ allein beobachtet, so daß die Autoren daraus schlossen, GAT-1 könne einen für Kationen permeablen Kanal bilden. Ein passiver Na^+ -Transport am GAT-1, wie er für einen Kationenkanal typisch ist, konnte nicht bestätigt werden [Loo *et al.* 1999], jedoch konnten kürzlich Untersuchungen bei Abwesenheit von Natrium und sehr negativem Potential eine Leitfähigkeit für Lithiumionen feststellen, welche einem Lithiumkanal gleicht und verschwindet, sobald Natrium hinzugegeben wird [MacAulay *et al.* 2002]. Unter Berücksichtigung von Kanalverhalten anderer Transportproteine wurde ein Transportmodell ersonnen, bei welchem je nachdem, ob Na^+ oder Li^+ an die erste Kationenbindungsstelle des GAT-1 gebunden hat, unterschiedliche Konformationen vorlägen, wobei lediglich die Konformation mit Li^+ zu einem Kanal führe. Weil die Affinität jener Bindungsstelle für Na^+ wesentlich höher sei, als für Li^+ , läge im Falle einer Na^+ -Anwesenheit nie die Kanal-Konformation vor, obwohl Na^+ ansich durch diesen Kanal permitieren könnte.

Da eine Reihe von Cotransportern einen passiven Wassertransport aufweisen, wurde hiernach auch bei GAT-1 gesucht. Loo *et al.* [1999] konnten eine auf Wassereinstrom zurückzuführende Volumenänderung in GAT-1 exprimierten Zellen beobachten, welche mit Hilfe des GAT-1-Inhibitors SKF89976A gehemmt werden konnte. GAT-1 schien sich demnach wie ein Wasser-Kanal zu verhalten.

Ebenfalls untersucht wurde die Affinität von Protonen bei der Bindung an GAT-1 und somit die Möglichkeit für GAT-1, Protonen anstelle von Na^+ zu transportieren. Grossman und Nelson [2002] wiesen hier eine leichte Konkurrenz der Protonen mit Na^+ an dessen

Bindungsstellen nach, jedoch tragen Protonen zu keinem wesentlichen Transport von GABA bei.

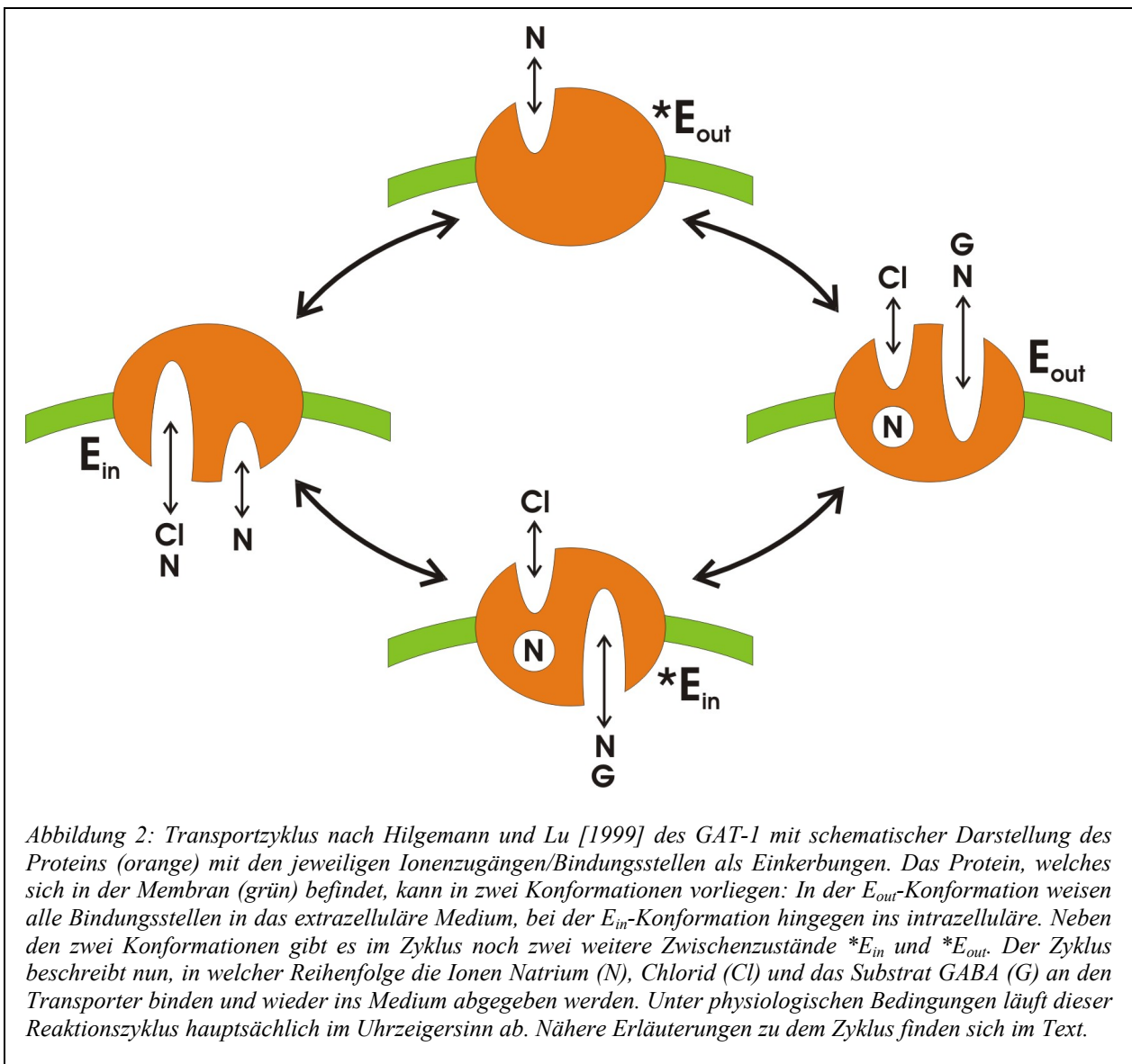
Elektrophysiologische Methoden erwiesen sich auf Grund der Elektrogenität des Transports als das Mittel der Wahl, denn so war es auch möglich, neben der Stöchiometrie Bindungsaffinitäten und Reaktionskinetiken des GAT-1 zu entschlüsseln, wodurch ein einigermaßen vollständiges Bild des Transportzyklus erhalten werden konnte. Erste Messungen am GAT-1 zeigten, daß extrazellulär GABA und Na^+ , aber vermeintlich auch Cl^- unbedingt notwendig waren, um einen Transportstrom zu generieren. Wenn Substrat und Coionen in genügender Konzentration vorhanden waren, erzielte man eine maximale Transportrate von 11 Zyklen/s, wobei pro Zyklus $1,1 \text{ e}^+$ in die Zelle transportiert wurden [Mager *et al.* 1993; Cammack *et al.* 1994]. Man entwarf in diesem Zusammenhang bereits ein grobes Kanalmodell mit potential- und konzentrationsabhängigen Tormechanismen (gates) für den Transportzyklus, dieses war jedoch noch nicht in der Lage, alle interessierenden Phänomene zu beschreiben. Desweiteren entdeckte man bei Abwesenheit von GABA einen transienten Strom, der die Charakteristik eines kapazitiven Entladestroms aufwies und durch extrazelluläres Na^+ kontrolliert wurde. Mager *et al.* [1996] konnten durch den Vergleich ihrer Meßdaten mit dem Modell der Hill-Kinetik den Verdacht erhärten, daß unter physiologischen Bedingungen extrazellulär 2 Na^+ und 1 Cl^- an den Transporter binden und daß dies anschließend die sofortige Bindung von GABA einleitet. Somit wurde erstmals eine Chronologie für den Bindungsprozeß vorgeschlagen. Ergänzt wurden die dargestellten Annahmen durch die Vermutung, außerdem spiele Cl^- eine bedeutende Rolle für die Affinität der Na^+ Bindung. Auf Grund der Na^+ -Konzentrationsabhängigkeit der transienten Ströme war es naheliegend, daß letztere durch Bindung eben dieses Coions verursacht würden. Eine weitere Arbeit von Mager *et al.* [1998] verglich die Ergebnisse aus Analysen der transienten Ströme mit einem kinetischen Modell einer sequenziellen Na^+ -Bindung an den GAT-1, bei welchem lediglich das Binden des ersten Na^+ -Ions als potentialabhängig gilt. Die Meßdaten fügten sich gut in das Modell, was zwar die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer derartigen Bindungscharakteristik steigerte, jedoch noch kein Beweis war. Ein erstes umfassendes Modell für einen Zyklus konnten Lu und Hilgemann mit einer großangelegten Arbeit, welche sich über drei Veröffentlichungen erstreckte, vorlegen [Lu und Hilgemann 1999b; Lu und Hilgemann 1999a; Hilgemann und Lu 1999]. Die erste dieser drei Arbeiten befaßte sich mit den Steady-State-Strömen des GAT-1, also jenen elektrischen Strömen, welche durch die kontinuierliche Arbeit des mGAT-1 generiert wurden. Sie konnte bestätigen, das Na^+ -Ionen noch vor GABA, aber auch noch vor Cl^- an den Transporter binden. Nicht

bestätigt wurde die Behauptung extrazelluläres Cl^- sei notwendig, um einen Einwärtsstrom zu generieren. Da den Autoren bei der von ihnen angewandten Methode, nämlich der des Patch-Clamp im Inside-Out-Modus, die Membraninnenseite zum schnellen Lösungswechsel zur Verfügung stand, war es ihnen möglich, die Bindungscharakteristika der intrazellulären Seite des GAT-1 näher zu studieren. Sie fanden, daß unbedingt sowohl GABA, Na^+ als auch Cl^- intrazellulär vorliegen mußten, damit GAT-1 einen Auswärtsstrom erzeugen konnte. Cl^- band vor allem anderen an die intrazelluläre Seite und vermochte dort einen Einwärtsstrom stark zu inhibieren. Die ohne intrazelluläres Cl^- gemessenen Transportraten waren deshalb um einiges höher als bei Mager et. al., der an intakten Zellen gemessen hatte, deren Zytosol nicht Cl^- -frei ist. Überhaupt erwies sich, was die Rate betraf, der ratenlimitierende Schritt des Einwärtsstroms bei geringen Potentialen als potentialabhängig, während er bei sehr negativen Potentialen potentialunabhängig wurde. Auf der anderen Seite gab sich der ratenlimitierende Schritt des Auswärtsstroms als kaum potentialabhängig zu erkennen.

Es zeigte sich für GABA eine um Größenordnungen höhere Affinität der extrazellulären Bindungsstelle gegenüber der intrazellulären, was sich in unterschiedlichen $K_{1/2}$ -Werten für GABA äußerte. War es möglich, einen Einwärtsstrom mit einigen zehn Mikromol extrazellulärem GABA zu erhalten, waren hingegen intrazellulär für einen Auswärtsstrom ein paar Millimol nötig. Eine spätere Arbeit [Sitte *et al.* 2002], die dieses Verhalten genauer untersuchen konnte, fand einen Unterschied von 3 Größenordnungen und ermittelte für den Einwärtstransport einen K_m von $10,8\mu\text{M}$ und für den Auswärtstransport einen K_m von 12mM . Die zweite Arbeit von Lu und Hilgemann beschäftigte sich mit den transienten Strömen. Es wurde hierfür ein Reaktionsmodell vorgeschlagen, bei welchem bei Abwesenheit von GABA der Transporter in zwei wesentlichen, miteinander konkurrierenden Konfigurationen vorliegen sollte, nämlich einmal mit Na^+ -Bindungsstellen auf extrazellulärer und einmal mit Cl^- -Bindungsstellen auf intrazellulärer Seite. Die Okklusion eines Na^+ -Ions wäre hier mit dem elektrogenen Schritt verknüpft. Unter Voraussetzung dieses Modells stellte sich der elektrogene Schritt als der langsamste dar, und intrazelluläres Cl^- konkurrierte mit extrazellulär okkludiertem Na^+ . Außerdem wurde vermutet, daß der elektrogene Schritt auf eine Konformationsänderung und nicht auf eine Diffusion der Ionen in einem Zugangskanal zu ihren Bindungsstellen zurückzuführen sei. Es wurde zwischen langsamen, auf extrazelluläres Na^+ zurückzuführende Ladungsverschiebungen und ein bis zwei Größenordnungen schnelleren Ladungsverschiebungen, die teilweise auf eine Interaktion von intrazellulärem Cl^- mit dem GAT-1 zurückgeführt werden konnten, unterschieden. Jedenfalls waren die langsamen kaum potentialabhängig und beeinflussten so nur unwesentlich die

potentialabhängigen GAT-1-Transportströme. Für einen extrazellulär mit Na^+ und Cl^- beladenen Transporter konnten in Abwesenheit von GABA keine transienten Ströme nachgewiesen werden.

Die dritte Arbeit von Lu und Hilgemann faßte nun die Daten zu einem Modell zusammen, welches die Transportfunktion des GAT-1 als Reaktionszyklus (Abbildung 2) rekonstruierte. Hierbei ging man, wie bereits schon bei der Beschreibung der transienten Ströme, grundsätzlich von zwei unterschiedlichen Konformationen des Proteins aus. In dem Falle, daß die Bindungsstellen für zwei Na^+ - und ein Cl^- -Ion ins Zytosol wiesen, läge die Konformation E_{in} vor. Bei der Konformation E_{out} hingegen wäre bereits ein extrazelluläres Na^+ okkludiert, während die anderen Bindungsstellen extrazellulär noch zur Besetzung freistünden.



In dem Moment, in dem an der E_{in} -Konformation alle Bindungsstellen frei lägen, erfolgte eine Konformationsänderung von E_{in} nach E_{out} , wobei zunächst eine extrazelluläre Bindungsstelle zugänglich würde (E_{out}^*), an die das erste Natrium bände und okkludierte. Das Modell verlangte entlang dieses Reaktionsablaufes das Vorhandensein des elektrogenen und zugleich ratenlimitierenden Schrittes. Nach der Okklusion wären auch die Bindungsstellen für das zweite Na^+ sowie GABA und Cl^- frei. Bei extrazellulärer Abwesenheit von Cl^- könnte es hierbei zu einem GABA-GABA-Austausch durch eine Konformationsänderung zwischen dem Zustand E_{out} und einem Zustand E_{in}^* kommen. Der volle Zyklus könnte hierbei nicht durchlaufen werden, weil extrazelluläres Cl^- beim Zustand E_{in}^* benötigt würde, um das okkludierte Na^+ intrazellulär freigegeben zu können und in den Zustand E_{in} überzugehen. Dieser von den Autoren vorgeschlagene Reaktionszyklus und die daran anschließende kinetische Analyse führte zu einer relativ guten Übereinstimmung zwischen berechneten und gemessenen Daten.

Um den Prozeß der vermuteten Konformationsänderung näher zu untersuchen, wurde der Transporter an der Stelle Cys74, welche sich in der Aminosäureregion befindet, in der die Na^+ -Bindungsstellen angenommen werden, mit einem Fluoreszenzmarker versehen [Li *et al.* 2000]. Durch Fluoreszenzmessungen konnte beobachtet werden, ob sich die Marker auf der intra- oder extrazellulären Seite der Zellmembran aufhielten. Dabei gelang der Nachweis, daß nach dem Modell von Lu und Hilgemann beim Übergang von E_{in} nach E_{out} eine Konformationsänderung stattfindet. Mehr noch, es wurde darüber hinaus nachgewiesen, daß zwischen den zwei Zuständen E_{out}^* und E_{out} noch ein zusätzlicher Zustand E_{out}^* -flow existieren müßte, in welchem das erste Na^+ bereits okkludiert sein und für das zweite Na^+ bereits eine Bindungsstelle zur Verfügung stehen sollte, nicht jedoch für Cl^- und GABA. Die im selben Jahr erschienene, bereits erwähnte Arbeit von Loo *et al.*, die radioaktive Flux-Messungen mit elektrophysiologischen Messungen verglich, konnte eine direkte Korrelation zwischen transportierter Ladung und transportierten Na^+ -Ionen zeigen und somit einen starken Hinweis liefern, daß diese Ladungsverschiebung eben durch im elektrischen Feld bewegte Na^+ -Ionen verursacht wird. Für den ebenfalls postulierten Cl^- - Cl^- -Austausch, welcher sich nicht durch den Zyklus von Lu und Hilgemann erklären läßt, wurde jedoch kein alternatives Modell vorgestellt. Die Autoren wollten lediglich einen Umkehrtransport als Erklärung für den Austausch ausschließen. Ob die Na^+ -Ionen auf Grund einer Konformationsänderung oder Diffusion entlang des elektrischen Feldes bewegt werden, um zur gemessenen Ladungsverschiebung beizutragen, klärte die Arbeit von Binda *et al.* [2002]. Sie fanden durch temperaturabhängige Messungen, daß Na^+ eine Diffusionskammer

durchqueren mußte, um an die Bindungsstellen zu gelangen, welche aber nicht innerhalb des elektrischen Feldes lag. Hingegen sollte eine darauffolgende Konformationsänderung, auf Grund welcher Na^+ durch das Feld bewegt würde, zum elektrogenen Schritt beitragen. Eine weitere Arbeit konnte zum Verständnis eines Mechanismus beitragen, welchem die Spezifität der Bindungsstellen für die jeweiligen Coionen zugrunde liegt [Bossi *et al.* 2002]. So scheint der Zugang zu den Bindungsstellen durch den Ionenradius und/oder elektrostatische Wechselwirkungen bestimmt zu sein.

Fesce *et al.* [2002], welche ebenfalls transiente Ströme näher untersuchten, entwickelten eine 3-Zustandskinetik, mit Hilfe welcher die bei transienten Strömen auftretenden Phänomene hinreichend erklärt werden konnten. Das Modell betrachtet nur einen beweglichen Ladungsträger und – bei Abwesenheit von GABA – zwei Zustände. Beim Übergang von ersten zum zweiten Zustand durchquert dem Modell zufolge die Ladung ausgehend vom extrazellulären Medium diffusionsartig die Membran, an der das elektrische Feld anliegt und ist kurz vor der Freisetzung ins Zytosol okkludiert. Bei Anwesenheit von GABA folgt ein dritter Zustand, in welchem das GABA an den Transporter bindet. Hierdurch wird eine Konformationsänderung initiiert, welche sowohl Ladung als auch GABA ins Zytosol entläßt und dem Transporter in den ersten Zustand zurückzukehren gestattet. Dieses Modell wurde auch für die hier vorliegende Arbeit zugrundegelegt, um die Natriumbindungskinetik zu beschreiben.

I.A.4. N-Glykosylierung

Für den folgenden einführenden und demgemäß allgemeingehaltenen Teilabschnitt, der sich mit der N-Glykosylierung von Glykoproteinen beschäftigt, zu welchen auch der GAT-1 mit seinen drei N-Glykosylierungsstellen zu zählen ist, sei auf zwei sehr zu empfehlende Review-Artikel von Parodi [2000] sowie von Roth [2002] verwiesen.

Der sekretorische Weg der Biosynthese führt Proteine, ausgehend von den Ribosomen, entlang des endoplasmatischen Reticulums (ER) und des Golgi-Komplexes (alles Zellorganellen im Zytosol der Zellen) bis zu ihrem Bestimmungsort; für Membranproteine ist dies die Zellmembran. Im ER wird das Lipid-verknüpfte Oligosaccharid $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Dol-P-P stufenweise aus einzelnen Zuckergliedern (den Monosacchariden Glukose, Mannose und N-Acetylglukosamin) zusammengefügt, ein Prozeß, der evolutionär offenbar in höchstem Maße konserviert worden ist. Anschließend wird das sowohl in pflanzlichen und pilzlichen als auch in tierischen Zellen identische Oligosaccharid als ganzes an Asparagin-Stellen der noch

im Aufbau befindlichen Proteine transferiert. Diesen Vorgang bezeichnet man als N-Glykosylierung, weil hierbei Oligosaccharide als Glykane an die N-Stellen des Proteins binden.

Auf der einen Seite erfährt nun das zunächst vorläufig zusammengefügte Oligosaccharid nach der Verknüpfung mit dem Protein eine Reihe von Veränderungen: Durch die Enzyme Glukosidase I und II werden drei Glukoseglieder entfernt. Darauf folgend findet mit Hilfe des Glykoproteins Glukosyltransferase, welches die unbedingte Anwesenheit von Ca^{2+} erfordert, eine transiente Reglukosylierung statt (Es soll in diesem Zusammenhang nicht unerwähnt bleiben, daß das ER abgesehen davon, daß es große Bedeutung für die Proteinbiosynthese besitzt (vgl. o.) auch dadurch ausgezeichnet ist, daß es das größte Ca^{2+} -Depot der Zelle darstellt). Im weiteren Verlauf entfernt das Enzym Mannosidase einige Mannose-Glieder. Dieser letztere Prozeß des sog. Trimmens der Oligosaccharide ist evolutionär von niederen wie höheren eukariotischen Zellen konserviert und spielt wohl bei zellulären Vorgängen, die der Überprüfung der Proteinqualität dienen, eine entscheidende Rolle.

Auf der anderen Seite aber beeinflusst die N-Glykosylierung unter anderem die Faltung der Proteine mit denen die Oligosaccharide verknüpft sind. Manche Proteine benötigen für ihre korrekte Faltung alle ihre N-Oligosaccharide. Bei anderen indes erweisen sich bestimmte N-Oligosaccharide als für eine korrekte Faltung besonders wichtig, oder es kann auf manche gar verzichtet werden.

Falsch gefaltete oder zusammengesetzte Glykoproteine können posttranslational durch verschiedenste Chaperone repariert werden. Falls der entsprechende Mechanismus ausfallen sollte, findet in den meisten Fällen eine Degradierung dieser Glykoproteine durch zytosolische Proteasome statt; dennoch findet bei einigen fehlgefalteten Glykoproteinen keine Degradierung statt, so daß sie in der Membran exprimiert werden können. Welche Merkmale für die Erkennung der Fehlfaltung durch Proteasome verwandt werden, ist bis jetzt unklar.

Für den Transport der Glykoproteine vom ER zum Golgi-Apparat sind unter anderem die sog. „pre-Golgi intermediates“ verantwortlich, welche sich entlang von Mikrotubuli bewegen. Sowohl an den pre-Golgi intermediates als auch bereits im Golgi-Apparat selbst erfahren die Glykoproteine einen weiteren Trimm-Vorgang durch das Enzym Endomannosidase, von welchem angenommen wird, daß es die weitere Oligosaccharid-Prozessierung im Golgi-Apparat einleitet. Der Golgi-Apparat selbst verfügt nun über Enzyme, welche die Zuckerketten der Oligosaccharide verkürzen (Golgi-Mannosidase) und verlängern (Glykosyltransferase) können. Hierdurch wird eine erstaunlich große Diversität innerhalb der N-verknüpften Oligosaccharide geschaffen, welche letztendlich den

Proteinerkennungsmechanismen der Zelle dienlich ist, durch die die Hinführung der Proteine an ihren jeweiligen Bestimmungsort ermöglicht wird. Für Glykoproteine, welche in der Zellmembran exprimiert werden, konnte gezeigt werden, daß die am Protein haftenden N-verknüpften Oligosaccharide keineswegs ihre im Golgi-Apparat modifizierte Struktur beibehalten [Porwoll *et al.* 1998]. Vielmehr kommt es zu einer fortwährenden Modifikation dieser Oligosaccharide. Ob dies jedoch an der Zelloberfläche selbst geschieht oder nach einer Endozytose im Zytoplasma, ist noch unklar.

Für das GAT-1-Protein lieferte bereits 1992 eine Arbeit von Keynan *et al.* einen starken Hinweis darauf, daß die N-Glykosilierung am GAT-1 einen Einfluß auf die Proteinexpression in der Zellmembran zu haben scheint [Keynan *et al.* 1992]. Die Autoren verwandten für ihre Messungen das Antibiotikum Tunicamycin, welches als ein Inhibitor der Glykosilierung gilt [Elbein *et al.* 1981]. Die bereits angesprochene Arbeit von Bennett und Kanner [1997] untersuchte neben dem Wild-Typ des mGAT1 auch die N-Glykosilierungsmutanten NDN, NDD, DDN sowie DDD. Die Mutanten wiesen Punktmutationen an den N-Glykosilierungsstellen (vgl. Abbildung 1) des GAT-1 auf, um dort eine Glykosilierung zu verhindern. Die Mutante DDN fand auch für die hier vorliegende Arbeit Verwendung (zur Erläuterung der Nomenklatur siehe im Methodenteil, Kapitel II.A.1). Durch Immunoprecipitation konnten proteingrößenabhängige Mobilitätsmessungen an den Proteinen durchgeführt werden. Es zeigten sich nun bei Abwesenheit von Tunicamycin unterschiedliche Mobilitäten, während bei Anwesenheit des Inhibitors die Mobilität aller genauso groß war wie die der Mutante DDD bei Abwesenheit des Inhibitors. Hieraus wurde geschlossen, daß alle drei N-Glykosilierungsstellen des GAT-1 beim Wild-Typ glykosiliert sind. Durch Flux-Messungen an HeLa-Zellen mit radioaktivem [³H]-GABA fand man eine reduzierte Aktivität der Mutante DDD, welche an allen drei N-Glykosilierungsstellen mutiert war. Die Autoren führten dies zum Teil auf einen reduzierten intrazellulären Transport und Membraneinbau der Proteine zurück, da in Liposomen, in denen die Proteine rekonstituiert wurden, ein geringerer Unterschied in der Aktivität zwischen dem Wild-Typ und der Mutante DDD festgestellt werden konnte.

Die neuste Arbeit über N-Glykosilierung am GAT-1 fußt unter anderem ebenfalls auf Flux-Messungen mit [³H]-GABA, wobei hier Oozyten des *Xenopus laevis* als Expressionssystem benutzt wurden [Liu *et al.* 1998]. Eine starke Inhibierung der GABA-Aufnahme konnte dabei auch für Mutanten nachgewiesen werden, die an lediglich zwei der drei N-Glykosilierungsstellen mutiert waren, nämlich DND, sowie zwei weitere, welche auch in der hier vorliegenden Arbeit untersucht wurden: DGN und DDN. Die Mutante DGN zeigte sogar

eine völlige Inhibierung, so daß angenommen werden muß, daß diese Mutante zumindest in Oozyten nicht funktionell exprimiert wird. Die übrigen Mutanten beeinflussen die Transporteigenschaften des GAT-1 dergestalt, daß vor allem eine nachlassende Na^+ -Sensitivität die Folge ist. Nähere Details hinsichtlich der Ergebnisse dieser Untersuchung werden im Diskussionsteil (Kapitel V) vorgestellt.

I.B. Vorarbeiten von G.Q. Cai über N-Glykosilierung am GAT-1

Die vorliegende Arbeit wurde im Zusammenhang mit inzwischen abgeschlossenen Studien über die N-Glykosilierung am GAT-1 durchgeführt, welche G. Cai am Institut für Molekularbiologie und Biochemie, FU Berlin, tätigte und welche im Rahmen einer Tagung in Boston, Massachusetts 2001 bereits vorgestellt wurden [Cai *et al.* 2001]. Die relevanten Ergebnisse dieser Studien sollen im folgenden umrissen werden:

Für die Untersuchungen wurde ein DNA-Fusionskonstrukt von mGAT1 und GFP (siehe hierzu Methodenteil, Kapitel II.A.1) benutzt. Als Expressionssystem wurden CHO-Zellen (siehe Methodenteil, Kapitel II.A.2) verwendet. Durch die Methode der Immunoprecipitation und des Western-Blottings konnten für das Fusionskonstrukt in der Hauptsache zwei unterschiedliche Molekulargewichte von 96 kDA sowie 108 kDA an der ganzen Zelle ausgemacht werden. Eine Markierung von in der Membran exprimierten Proteinen mit Biotin zeigte, daß sowohl der Wild-Typ als auch alle untersuchten N-Glykosilierungsmutanten (DGN, DDN und DDQ) tatsächlich in der Zellmembran exprimiert waren. Während der Wild-Typ in der Membran nur die Bande bei 108 kDA aufwies, besaßen alle Mutanten ein wesentlich geringeres Gewicht bei etwa 96 kDA, wobei dasjenige der Doppelmutationen noch ein wenig über dem der Dreifachmutation lag. Die Gewichtsreduktion ist bei den Mutanten mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die fehlenden Oligosaccharide am Protein zurückzuführen. 96 kDA müßten also dem Gewicht des deglykosilierten GAT-1 entsprechen, jedoch liegt der auf Grund von Erkenntnissen hinsichtlich der GAT-1-Proteinstruktur berechnete Wert bei 67 kDA [Guastella *et al.* 1990]. Diese Differenz bezüglich des Gewichts kann mit dem hinzutretenden Eigengewicht des GFP, welches mit GAT-1 fusioniert ist, des Immunmarkers und schließlich auch des Biotins erklärbar sein.

Nachdem nachgewiesen war, daß neben dem Wild Typ des GAT-1 Transporters auch dessen Mutanten in die Zellmembran der CHO-Zellen exprimiert wurden, konnte mit funktionellen Studien derselben fortgefahren werden:

Radioaktive Flux-Messungen mit [^3H]-GABA zeigten bei den Mutanten eine um mindestens 50% reduzierte GABA-Aufnahme im Vergleich zum Wild-Typ, gemessen ebenfalls an DNA-transfizierten CHO-Zellen. Die Inhibition war im Falle der Dreifachmutation stärker ausgeprägt als bei den Doppelmutationen. War also bei diesen Untersuchungen von Cai *et al.* die GABA-Aufnahme auf Grund der Doppelmutation DGN reduziert, so entsprach dieses Ergebnis aber nicht dem aus der Arbeit von Liu *et al.* [1998]. Letztere stellten nämlich bei entsprechenden Flux-Messungen eine fast vollkommene Inhibition im Falle DGN fest, jedoch maßen die Autoren am Expressionssystem der Oozyte. Man muß also davon ausgehen, daß Oozyten und CHO-Zellen nicht für alle Glykoproteine die gleiche Art der Biosynthese aufweisen und so als deren Resultat in einem Falle funktionelle, im anderen Fall nicht-funktionelle Proteine in der Membran vorliegen (bzw. als nicht-funktionell auch erst gar nicht dorthin gelangen).

Um nachzuprüfen, ob die auftretenden Unterschiede zwischen Wild-Typ und Mutanten auf das Unterbinden der Glykosilierung zurückgeführt werden können und nicht auf andere durch die Mutation verursachte Einflüsse zurückgehen, wurde mit einem Inhibitor der Glykosilierungsprozessierung gearbeitet: dem Mannosidase-I-Inhibitor dMM (1-Deoxymannojirimycin). Dieser Inhibitor erzeugte jedoch die gleichen Effekte wie die Mutanten, sowohl bei der Bestimmung des Molekulargewichts als auch bei den Messungen der GABA-Aufnahme. Somit können die gemessenen Effekte bei den Mutanten mit ziemlicher Sicherheit auf das Ausbleiben von N-verknüpften Oligosacchariden am GAT-1 zurückgeführt werden.

I.C. Fragestellung

Frühere Untersuchungen an Oozyten des *Xenopus laevis* haben bereits gezeigt, daß die Glykosilierung am GAT-1 durch N-Oligosaccharide nicht nur die Expression dieser Transportproteine beeinflußt, sondern auch eine funktionelle Relevanz für GAT-1-Proteine besitzt [Liu *et al.* 1998]. Vorarbeiten an transfizierten CHO-Zellen zeigen eine durch die N-Glykosilierung verminderte GABA-Aufnahme in die Zelle [Cai *et al.* 2001].

Die vorliegende Arbeit hat in diesem Zusammenhang nun **zum einen** zur Aufgabe, nachzuprüfen, ob der Unterschied in der GABA-Aufnahme an CHO-Zellen auf eine geänderte Expression oder auf einen funktionellen Einfluß des GAT-1 zurückzuführen ist. Für die Studien der Transportfunktion soll dabei als elektrophysiologische Methode das Patch-Clamp-Verfahren genutzt werden. Vor allem soll jedoch die Na^+ -Bindungskinetik am GAT-1

untersucht werden. Zwar wurden diesbezüglich bereits in früheren Arbeiten erste Schritte unternommen, Zeitkonstanten der durch Na^+ verursachten transient auftretenden Ströme indes wurden nicht gemessen. Die Kenntnis dieser Zeitkonstanten allerdings ist unerlässlich, um den Einfluß der N-Glykosilierung auf die Na^+ -Bindungskinetik studieren zu können.

Da die oben erwähnten Vorarbeiten zudem Hinweise darauf lieferten, daß in den unterschiedlichen Expressionssystemen der CHO-Zelle und der Oozyte die Glykosilierung zu unterschiedlichen Glykoproteinen führen kann, soll **zum anderen** die Aufgabe dieser Arbeit darin bestehen, einen Vergleich der anhand von CHO-Zellen gewonnenen Ergebnisse mit denen in der Literatur für Oozyten vorliegenden anzustellen.

II. Methoden

II.A. Biologische Methoden

II.A.1. DNA-Konstrukt des mGAT1-Transporters und seiner N-Glykosylierungspunktmutanten

Die für diese Arbeit verwendete komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) des neuronalen mGAT1-Transporters der Maus sowie die durch Punktmutationen veränderte cDNA des mGAT1 erhielten wir dankenswerter Weise von Herrn G. Cai aus der Arbeitsgruppe von Frau H. Fan, Institut für Molekularbiologie und Biochemie, FU Berlin.

Die cDNA war mit Hilfe der Enzyme HindIII und StuI in den P-Alter-1-Transkriptionsvektor kloniert worden [Liu *et al.* 1998] und wurde unter Verwendung der Enzyme HindIII und SmaI in den PEGFP-N2-Transkriptionsvektor (BD Bioscience Clontech, Palo Alto, Kanada) subkloniert. In diesen Vektor ist bereits die DNA des Green-Fluorescence-Proteins (GFP) implementiert, welche bei der Transkription zusammen mit der des mGAT1 ausgelesen wird. Es handelt es sich hierbei jedoch nicht um den Wild-Typ des vom *Aequorea victoria* stammenden GFP, sondern um eine rot-verschobene Variante [Cormack *et al.* 1996] desselben mit einem Erregungsmaximum bei 488nm Wellenlänge und einem Emissionsmaximum bei 507nm Wellenlänge. Auf Grund dieser Eigenschaft des Vektors exprimiert die DNA-transfizierte Zelle ein Proteinfusionskonstrukt aus mGAT1 und GFP. Es läßt sich so der für die Messungen notwendige Expressionsgrad der mit mGAT1 exprimierten Zellen abschätzen, indem das GFP unter dem Mikroskop zum Fluoreszieren gebracht wird.

Weiterhin wurden an 2 von 3 N-Glykosylierungsstellen Asn176, Asn181 und Asn184, welche sich beim mGAT1-Protein in der extrazellulären Schleife zwischen der 3 und 4 transmembranen Domäne befinden (vgl. Kapitel I.A.2), Punktmutationen vorgenommen [Liu *et al.* 1998]. Durch die Mutationen wurde an den N-Glykosylierungsstellen die Aminosäure Asparagin durch Aspartat oder Glycin ausgetauscht, wodurch zwei mGAT1-Mutanten entstanden, nämlich DGN (Asp176, Gly181, Asn184) und DDN (Asp176, Asp181, Asn184).

II.A.2. Verwandtes Zellsystem: CHO-Zelle

Bei der benutzen Säugerzelllinie handelt es sich um Ovarzellen des chinesischen Hamsters (deshalb die Bezeichnung „CHO“ für engl. Chinese Hamster Ovary). Sie ist ein Subklon einer elterlichen Zelllinie, welche 1957 aus der Biopsie eines adulten chinesischen Hamsters gewonnen wurde [Puck *et al.* 1958; Ham 1965; Kao und Puck 1968]. Die genaue Bezeichnung, wie sie auch die deutsch Zellkultursammlung benutzt, ist CHO-K1. Der Grund für die Benutzung dieser Zelllinie ergab sich aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Frau H. Fan, Institut für Molekularbiologie und Biochemie, FU Berlin, auf welchen diese Arbeit aufbaut. Da die Vorarbeiten ebenfalls an der CHO-Zelllinie getätigt wurden, war es sinnvoll, das gleiche Expressionssystem zu verwenden. Die CHO-Zellen besitzen keine endogenen durch GABA induzierbaren Leitfähigkeiten und eignen sich deshalb hervorragend für die Messungen, zumal sie auch gegenüber anderen Zelllinien unempfindlicher auf Transfektion und Patch-Clamp-Experimente reagieren. Die kultivierte CHO-Zelllinie erhielten wir dankenswerter Weise von Herrn G. Cai aus der Berliner Arbeitsgruppe.

II.A.3. Kultivierung der CHO-Zellen

Die CHO-Zellen werden in 5ml eines Kulturmediums, dem sog. Alpha-Medium (III.A.1.a)), kultiviert und befinden sich dabei in 50ml-Kulturflaschen („Nuncion“, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden), auf deren Böden sie adhären. Im Alpha-Medium ersetzt das Dipeptid L-Alanyl-L-Glutamin das sonst in Medien für Eukaryonten vorkommende L-Glutamin, da ersteres eine höhere Stabilität aufweist. Das Alpha-Medium ist durch ein Bicarbonatsystem gepuffert. Dieses Puffersystem reagiert empfindlich auf gelöstes CO₂; bei einem normalen atmosphärischen Druck und einem CO₂-Gasgehalt über dem Medium von 5% stellt sich ein pH-Wert von 7,2 in letzterem ein. Hingegen reagiert das Medium, wenn es der normalen Atmosphäre ausgesetzt wird, basisch. Der pH-Wert lässt sich durch die Rotfärbung des im Medium enthaltenen Phenolrots beobachten. Die CHO-Zellen werden zur Kultivierung in einem Begasungsbrutschrank („B5060 EC/CO₂“, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) bei 5% CO₂-Gasgehalt aufbewahrt, eben um das Medium auf dem entsprechenden pH-Wert zu halten.

Alle 2 bis 4 Tage, je nach Bewuchsdichte der Kulturflaschen, welche zu Beginn mit Zellen angeimpft wurden, müssen die Zellen passagiert werden, d.h. es müssen neue Kulturflaschen mit diesen Zellen angeimpft werden, da der Bewuchs des Flaschenbodens bereits zu dicht ist

und die Zellen sich abzulösen beginnen. Hierfür wird aus der Kulturflasche mit den Zellen das alte Medium entnommen. Auf die Zellen wird zweimal jeweils für 30 sec die calciumfreie Pufferlösung PBS (Life Technologies GmbH, Karlsruhe) gegeben. Daraufhin wird für 2 min mit der (weil EDTA-haltigen) calciumbindenden Lösung Versene inkubiert. Die Abwesenheit von Calcium bewirkt eine teilweise Loslösung der Zellen vom Flaschenboden. Die Lösung Versene wird also mit 2,5 ml neuem Alpha-Medium ausgetauscht, wobei durch die mechanische Einwirkung des ein- und ausströmenden Mediums unter Zuhilfenahme einer Pipette die Zellen vollends vom Boden abgelöst und vereinzelt werden. Häufig wird zudem das Enzym Trypsin verwendet, weil es die Zellenablösung erleichtert und deshalb eine nur leichte mechanische Beanspruchung der Zellen stattfindet. Da für unsere Arbeit jedoch ausgeschlossen werden sollte, daß das Trypsin evtl. das in den Zellen exprimierte mGAT1-Protein andaut, wurde von einer Trypsinbehandlung abgesehen.

Ein paar Tropfen der entstandenen Zellsuspension genügen, um eine neue Kulturflasche, gefüllt mit Alpha-Medium, anzupfen. Um eine ausreichende Qualität der Zellen zu gewährleisten, sollten mit den Zellen nicht mehr als 30 Passagen durchgeführt werden. Es ist deshalb sinnvoll, neu erhaltene Zellen, wie die für diese Arbeit aus Berlin erhaltenen CHO-Zellen, nach ein paar Passagen zu aliquotieren und bei -80°C aufzuheben. Dadurch stehen immer frische Zellen zur Verfügung, die nur wenige Passagen hinter sich haben.

Die Vorgehensweise für die Einlagerung der Zellen bei -80°C ist zunächst die gleiche wie die der Passagierung. Das Alpha-Medium, welches zuletzt in die Kulturflasche gegeben wird, enthält jedoch 10% DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) als ein Antifrostmittel, welches eine zellzerstörende Kristallbildung verhindern soll (von einem sonst üblichen Zentrifugationsschritt zur Verdichtung der Zellsuspension wurde abgesehen, um die Zellen nicht zu schädigen). DMSO ist für die Zellen jedoch nicht sehr verträglich, weshalb die Zellsuspension, nachdem sie auf Aliquots von 2ml Volumen aufgeteilt wurde, gleich gekühlt werden muß: zunächst für eine langsame zellverträgliche Abkühlung 30 min lang auf Eis, wonach sie in eine -80°C -Truhe (hier: E80-180T, Colora Meßtechnik GmbH, Lorch) umgesetzt werden sollte.

In Anbetracht der selben DMSO-Unverträglichkeit wird die Zellsuspension zum Wiederaufwärmen und Weiterpassagieren sofort in eine Kulturflasche mit möglichst viel Medium (etwa 10ml) gegeben und bereits nach 24h erneut passagiert.

II.A.4. DNA-Transfektion der CHO-Zellen

Um die Zellen mit DNA zu transfizieren, wurden für diese Arbeit Liposomen-bildende Moleküle verwandt, welche die DNA durch die Zellmembran schleusen. Hierfür wurden Reagenziensätze von zwei unterschiedlichen Herstellern benutzt, welche sowohl Pufferlösungen als auch eine Lösung mit den Liposomenbildnern enthielten. Informationen zur Struktur der Liposomenbildner selbst werden von den Firmen geheimgehalten. Es ist lediglich bekannt, daß es sich unter anderem um eine Mischung aus verschiedenen Lipiden handeln soll. Der verwendete Reagenziensatz der Firma Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) trägt die Bezeichnung „SuperFect Transfection Reagent“ und wurde für einige der ersten Experimente verwendet. Da aber die Anzahl der Zellen, welche eine Expression des mGAT1 aufwiesen, zu gering war, wurde ein anderer Reagenziensatz mit größerer Expressionsrate ausgewählt. Letzterer, von der Firma Roche (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA) stammend, trägt die Bezeichnung „FuGENE 6, Transfection Reagent“. Im folgenden sollen die Protokolle für die Transfektion mit der DNA des mGAT1 Wild Typs sowie der N-Glykosilierungsmutanten aufgeführt werden:

II.A.4.a) Transfektionsprotokoll für das „SuperFect Transfection Reagent“ der Firma Qiagen

Die zu transfizierenden Zellen werden 24h vor Beginn der Transfektion in mit Alpha-Medium gefüllten 60mm-Zellkulturschalen („Nunclon“, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) ausplattiert (II.A.3). Der Schalenboden ist hierfür mit runden Glasplättchen (0,7mm x 0,17mm) ausgelegt. Die Zellkonzentration wird so groß gewählt, daß die Bewachung auf den Glasplättchen nach 48h licht genug ist, um noch einige zum Messen geeignete, freiliegende Zellen vorzufinden. Der Reagenziensatz für die Transfektion, welcher bei einer Temperatur von 4°C gelagert wird, besteht aus drei Lösungen: dem „Enhancer“, einem „Buffer EC“ und dem „Transfection Reagent“, welches die Liposomenbildner enthält. Für einen Transfektionsansatz einer 6mm-Kulturschale verwendet man 1µg in Wasser gelöste mGAT1-DNA und gibt sie bei Raumtemperatur in ein mit 150µl Buffer EC gefülltes 2ml-Eppendorfgefäß (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg). Danach durchmischt man den Inhalt des Gefäßes, indem man dieses für 1sec in eine Vibrationsapparatur („Vortex-Genie 2“, Scientific Industries, New York, USA) stellt (Einstellung Vortex-Stufe 1). Danach fügt man

dem Inhalt 8µl des Enhancers zu und durchmischt ihn nochmals auf die gleiche Art. Es folgt eine 5-minütige Inkubationszeit. Im Anschluß werden 10µl des Transfection Reagent dem Inhalt des Gefäßes hinzugefügt und nochmals gemischt, jedoch diesmal für 10sec, woraufhin für 10min inkubiert wird. In dieser Zeit wird das verbrauchte Alpha-Medium der Kulturschale durch 4ml frisches Alpha-Medium ausgetauscht. Schließlich wird der Inhalt des Eppendorfgefäßes mit 1ml Alpha-Medium aufgefüllt, durch langsames Auf- und Abpipettieren vermischt und in die Kulturflasche überführt. Da das Transfektionsreagenz bei zu langer Applikation einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen ausübt, wird der Kulturschale mit den Zellen nach 2 bis 3 Stunden das Medium mitsamt dem Reagenz entnommen. Die Kulturschale wird 2 mal mit PBS vorsichtig ausgespült, so daß die Zellen sich nicht ablösen, und mit frischem Alpha-Medium gefüllt. 24 h später haben die Zellen mehr oder weniger den mGAT1 exprimiert und können durch Herausnahme der Glasplättchen in die Meßkammer überführt werden.

II.A.4.b) Transfektionsprotokoll für das „FuGENE 6, Transfection Reagent“ der Firma Roche

Die zu transfizierenden Zellen befinden sich in einer 50ml-Kulturflasche mit Alpha-Medium (II.A.3), welche 36h zuvor mit den entsprechenden Zellen angeimpft wurde. Bei der Impfung wurde die Zellkonzentration so hoch gewählt, daß in der Folge die Fläche des Flaschenbodens einen Zellbewuchs von 80% -90% aufweist. Das Transfektionsreagenz „FuGENE6“ besteht aus nur einer Lösung, in welcher sich die Liposomenbildner befinden. Es wird bei einer Temperatur von -20°C gelagert. 6µl des Transfektionsreagenz werden bei Raumtemperatur auf 96µl Alpha-Medium ohne Serum (Rezeptur wie die, des Alpha-Mediums, jedoch ohne 10%-igen Volumenanteil an Serum) gegeben. Das serumfreie Alpha-Medium befindet sich hierbei in einem 2ml-Eppendorfgefäß, und es ist darauf zu achten, daß das Reagenz vor dem Mischen nicht mit der Kunststoffoberfläche des Gefäßes in Berührung kommt. Durch langsames fünfmaliges Auf- und Abpipettieren wird das Reagenz mit dem Medium vermischt. Danach wird 5min gewartet, bevor 2µg der in Wasser gelösten DNA hinzugegeben werden. Es wird dann nochmals auf die gleiche Art und Weise wie zuvor gemischt und schließlich eine Zeitspanne von 15min abgewartet. Diese Zeit nutzt man, um das verbrauchte Alphamedium in der Kulturflasche durch frisches zu ersetzen. Schließlich gibt man den gesamten Inhalt des Eppendorf-Gefäßes in die Kulturflasche mit den CHO-Zellen und stellt letztere für weitere 36h in den Brutschrank. Nach Ablauf dieser Zeit werden Zellen vom

Boden der Kulturflasche auf die gleiche Art und Weise abgelöst, wie dies auch beim Passagieren der Zellen zu Kultivierungszecken (II.A.3) geschieht. Die Zellen werden hierbei in mit Alpha-Medium gefüllte Kammern einer 24-Well-Multischale („Nunclon“, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) übertragen, auf deren Böden jeweils ein rundes Glasplättchen (10mm x 0,17mm) liegt. Die Zellkonzentration wird derart gewählt, daß die Glasplättchen nach 24 h, also zu dem Zeitpunkt, an dem die Experimente starten, einen Bewuchs aufweisen, bei dem man noch einzelne zur Messung geeignete, freiliegende Zellen finden kann.

II.B. Das Patch-Clamp-Verfahren

II.B.1. Einleitung

Bereits Ende des 18. Jahrhunderts wurden von Luigi Galvani elektrophysiologische Untersuchungen am Muskelgewebe von Fröschen durchgeführt. Mit der 1949 von Cole [Cole 1949] und Marmont [Marmont 1949] entwickelten und von Hodgkin, Huxley und Katz [Hodgkin *et al.* 1949; Hodgkin *et al.* 1952] weitentwickelten sog. Voltage-Clamp Methode war es möglich geworden, Stromableitungen an einigen cm-langen, elektrisch definiert erregten Tintenfisch-Axonon durchzuführen. Später etablierten sich Methoden, wie das Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Verfahren (TEVC) [Schwarz und Rettinger 2000], die es erlauben potentialabhängige Membranleitfähigkeiten an einzelnen, relativ großen Zellen im mm-Bereich zu messen. Beim TEVC werden mit Hilfe zweier Mikroelektroden, welche in die Zelle gestochen werden, der Zellmembran Potentialänderungen aufgezwungen. Gleichzeitig wird der über die Membran fließende Strom gemessen, woraus man eine Potentialabhängigkeit der Membranleitfähigkeit analysieren kann. Neher und Sakmann gelang es 1976 [Neher und Sakmann 1976] erstmals mit einer einzigen Mikroelektrode Spannungs- und Strommessung zu verwirklichen, und hierbei Kanalströme (ca. 10pA) einzelner, kanalbildender Proteinen sichtbar zu machen. Neher und Sackmann wurden für die Entwicklung des Patch-Clamp-Verfahrens 1991 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.

Das Patch-Clamp-Verfahren ist für diese Arbeit die elektrophysiologische Methode der Wahl, weil es erlaubt an CHO-Zellen mit einem Zellkörperradius von ca. 15µm Membranleitfähigkeiten und kapazitive Aufladevorgänge zu messen, und gleichzeitig das intra- und extrazelluläre Medium vorgeben zu können. Die hohe Zeitauflösung des Verfahrens und die Möglichkeit eines schnellen extrazellulären Lösungswechsels erhöht die Genauigkeit der Messungen und bieten so eine gute Voraussetzung für die Untersuchungen.

Als weiterführende Literatur zum Patch-Clamp-Verfahren sei an dieser Stelle das Buch von Smith, Lecar und anderen [Smith *et al.* 1985] sowie das von Neher und Sackmann [Neher und Sackmann 1995] empfohlen.

II.B.2. Theorie der Spannungsklemme

Die Membran einer biologischen Zelle verfügt sowohl über ohmsche (R_m) als auch kapazitive (C_m) elektrische Eigenschaften, wie im unteren Schema der Abbildung 3 verdeutlicht. Die Zelle, deren Zytosol selbst ein Elektrolyt darstellt, befindet sich für die Experimente in einer elektrolytgefüllten Meßkammer (II.B.3.b)). Die Meßkammer ist über eine Badelektrode geerdet. Mit Hilfe der Patch-Clamp-Elektrode (II.B.3.e)), welche ebenfalls elektrolytgefüllt ist, verschafft man sich bei der Whole-Cell-Konfiguration (II.B.3.h)) einen elektrischen, nach außen isolierten Zugang zum Zellinneren. Dieser Zugang ist jedoch ebenfalls durch einen Widerstand (R_s) gekennzeichnet, welcher in Serie mit dem Membranwiderstand verbunden ist und deshalb als Serienwiderstand bezeichnet wird. Dieser Aufbau mitsamt eines geeigneten Verstärkers erlaubt es der Zellmembran definierte Potentiale und Potentialänderungen aufzuzwingen. Hierdurch resultieren Ströme, welche die Kapazität der Membran umladen als auch über die Membranleitfähigkeit abfließen. Ziel des Patch-Clamp-Verfahrens ist es die durch die definiert aufgezwungenen Membranpotentiale hervorgerufenen Ströme zu messen. Da diese Ströme in einer Größenordnung von wenigen pA liegen, wird vom Meßverstärker eine entsprechende Empfindlichkeit verlangt. Weiterhin wird gefordert, daß die Reaktionszeit, mit der Spannungsänderungen aufgezwungen werden, im μ s-Bereich liegen soll. Diese Merkmale werden durch den Patch-Clamp-Verstärker EPC9 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht), der im Experiment verwandt wurde, gewährleistet. Ein vereinfachter Schaltkreis des Verstärkers ist in Abbildung 3 dargestellt:

Der über die Zellmembran fließende Strom I_m wird über einen Spannungsabfall am bekannten Widerstand R_f anhand des ohmschen Gesetzes bestimmt. Das an der Membran abfallende Potential V_m hingegen wird nicht im eigentlichen Sinne gemessen. Vielmehr wird zu jedem Zeitpunkt gewährleistet, daß das Membranpotential einem gewünschten und somit bekannten Potential V_{soll} entspricht. Um V_m auf V_{soll} zu regeln, besitzt der Patch-Clamp-Verstärker einen Regelkreis. Die Regelung übernimmt das Herzstück des Verstärkers, ein Operationsverstärker (OPV). Der OPV hat hochohmige Eingänge für V_m und V_{soll} , so daß dort keine Stromverluste entstehen können. Er erzeugt eine Ausgangsspannung V_{aus} , deren zeitliche Änderung einem vielfachen der Differenz der Eingangsspannungen entspricht:

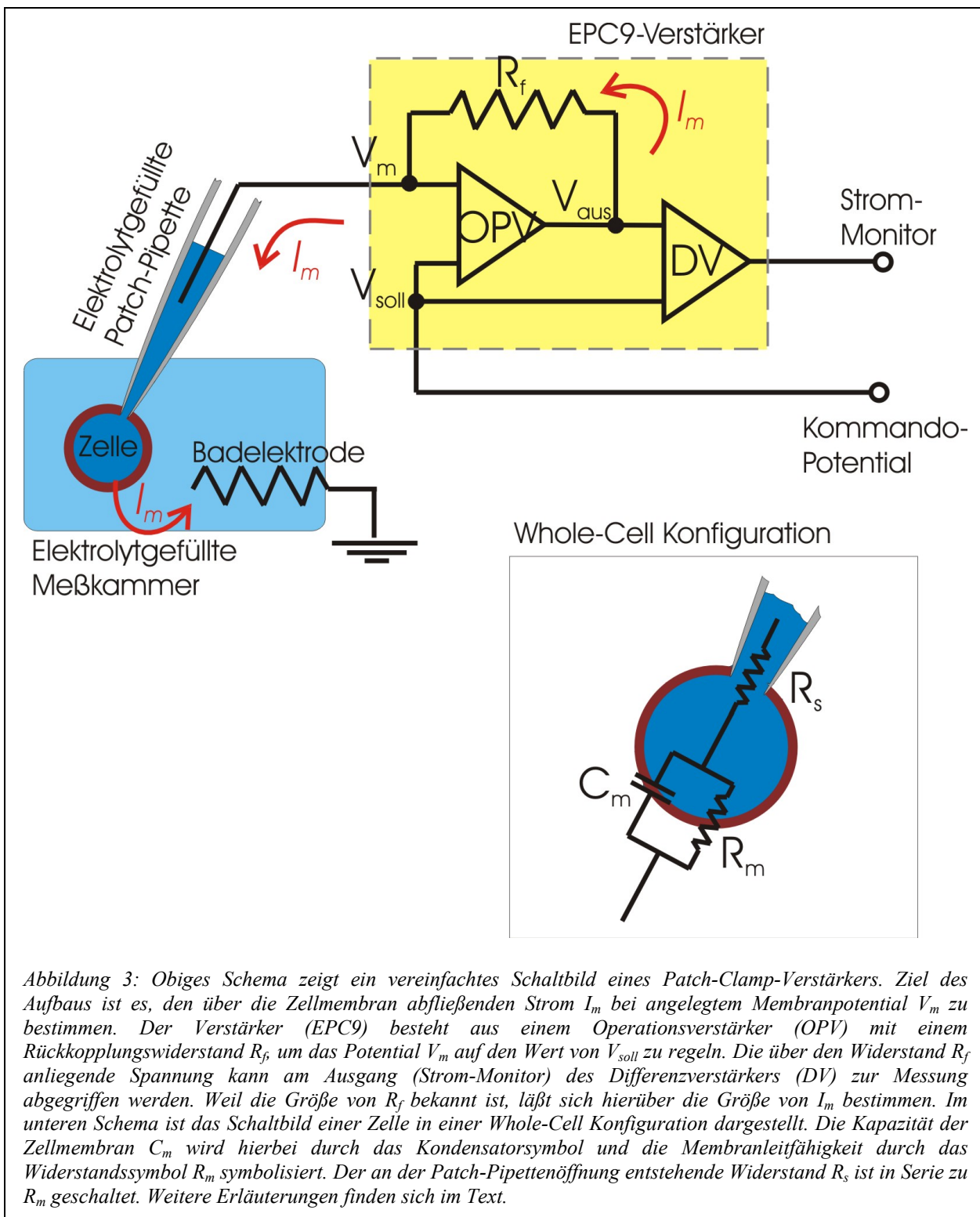
$$\frac{dV_{aus}}{dt} = \omega_A \cdot (V_{soll} - V_m) \quad \text{Gleichung 1}$$

Der Faktor ω_A steht für die Verstärkungsbandbreite des Operationsverstärkers und ist als Winkelfrequenz angegeben. Die Ausgangsspannung V_{aus} bewirkt einen Stromfluß I_m über den Rückkopplungswiderstand R_f , wodurch sich der Wert von V_m dem Wert von V_{soll} annähert. Der OPV regelt auf Grund der Rückkopplung solange nach, bis $V_m = V_{soll}$ ist. Der über den Rückkopplungswiderstand fließende Strom I_m ist also mit dem Strom identisch, welcher zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials $V_m = V_{soll}$ benötigt wird. Ein Differentialverstärker (DV) greift die am Widerstand R_f abfallende Spannung ab und stellt sie (entkoppelt vom Regelkreis) am Strom-Monitor-Ausgang zur Aufnahme zur Verfügung. Das Computerprogramm Pulse/Pulsefit (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht), welches mit Hilfe eines Rechners (Targa 800MHz Personal Computer mit Windows Me, Actebis International Distribution GmbH, Soest) und eines im EPC9-Verstärker implementierten Analog-Digital-Wandlers den Verstärker steuert und die Spannung am Strom-Monitor-Ausgang aufzeichnet, berechnet automatisch aus dem bekannten Widerstand R_f und den bekannten Verstärkungsfaktoren den Strom I_m .

Die Zeitdauer, in welcher nachgeregelt wird, hängt natürlich stark von dem Faktor ω_A ab. Er sollte möglichst groß sein, um eine schnelle Reaktion des Systems zu gewährleisten. Ist er jedoch zu hoch, übersteuert der Regelkreis und es kommt zu unerwünschten Spannungsschwingungen. Idealerweise besitzt ein Regelkreis natürlich eine Zeitkonstante mit dem Wert 0s. Der Rückkopplungswiderstand verfügt aber über kapazitive Eigenschaften, die den Regelkreis mit einer Zeitkonstanten im ms-Bereich zur Trägheit zwingen würde [Sigworth 1995]. Deshalb werden Korrekturschaltkreise (nicht im vereinfachten Schaltbild der Abbildung 3 eingezeichnet) benötigt, welche Zeitkonstanten im μ s-Bereich erlauben.

Desweiteren verfügt der Verstärker über die Möglichkeit der Kompensation kapazitiver Ströme. Ein Kompensationsmodus kompensiert schnellabfallende kapazitive Ströme, welche unter anderem durch die Elektrodenwandung der Patch-Elektrode hervorgerufen werden. Ein anderer Kompensationsmodus besitzt indes die Möglichkeit, die von der Membrankapazität C_m hervorgerufenen Ströme zu kompensieren. Man erhält in diesem Fall aus dem durchlaufenen Kompensationsprotokoll die Größen von C_m als auch von R_s .

Zwei in Reihe geschaltete Bessel-Filter filtern den Strom-Monitor-Ausgang des EPC9-Verstärkers und sind für die Experimente auf eine 1kHz Tiefpaßfilterung eingestellt, welches der Hälfte der verwendeten Aufnahmefrequenz (Samplingrate) entspricht.



II.B.3. Aufbau und Durchführung

II.B.3.a) Meßstand

Der Meßstand, wie er für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente Verwendung fand, ist in Abbildung 4 dargestellt und soll im folgenden beschrieben werden: Zur Beobachtung der Zellen und zur Fluoreszenzanregung derselben befindet sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch ein Mikroskop (Axiovert, Carl Zeiss, Jena), bei welchem die Objektive unterhalb des zu betrachtenden Objekts angebracht sind, weswegen es auch als Invertoskop bezeichnet wird. Oberhalb der Objektive befindet sich der Objektstisch mit der lösungsdurchflossenen Meßkammer (II.B.3.b)), in welche die Zellen während der Messung eingebracht werden. Die Meßkammer wird mit Hilfe der Objektive durch den Kammerboden eingesehen. Sie läßt sich in horizontaler Ebene frei über den Objektiven bewegen. Die Kammer liegt dabei - lediglich mitsamt einer flachen Halterungsscheibe aus Plexiglas versehen - auf dem gefetteten Objektstisch auf. Lösungen, welche die Meßkammer bespülen sollen, befinden sich in geeigneter Höhe (um den Fließdruck der Lösungszufuhr einzustellen) in offenen 50ml-Spritzen und werden von dort in Kunststoffschläuchen bis in die Meßkammer geführt. Weiterhin existiert für den schnellen Lösungswechsel während des Experiments ein Lösungswechsler (II.B.3.i)), welcher über einen Mikromanipulator (Bachhofer, Reutlingen) von oben in die Meßkammer eingetaucht werden kann. Sämtliche Lösungen in der Meßkammer werden über Schläuche mit einer Membranpumpe („miniport“, KNF Neuberger GmbH, Freiburg) abgesaugt. Um die Patch-Elektrode (II.B.3.e)) mitsamt dem Probenkopf an die zu messende Zelle heranzuführen zu können, ist diese ebenfalls an einem Mikromanipulator befestigt und zudem noch an einem hydraulischen Manipulator, welcher kontrollierte Verschiebungen im μm -Bereich zuläßt, angeschlossen. Die Patch-Elektrode ist gerade gegenüber dem Lösungswechsler positioniert. Senkrecht von oben findet die normale Beleuchtung des Objekts statt. Hier zeigen sich die Vorteile des Invertoskops, welches für sämtliche in die Meßkammer hereinragenden Aufbauten Raum geben kann. Das Mikroskop besitzt weiterhin eine Fluoreszenzeinrichtung. Eine Quecksilberdampflampe („HBO 50 W“, Osram GmbH, München) dient als Quelle des anregenden Lichts. Dieses wird durch eine mit Filtern und Halbspiegeln (Filterset für GFP, Carl Zeiss, Jena) besetzte Schiebevorrichtung in den Strahlengang des Invertoskops hineingespiegelt und auf einen Bereich um 488nm begrenzt. Emittiertes Licht des grün fluoreszierenden (507nm) GFP wird vor der Betrachtung

ebenfalls gefiltert. Eine am Mikroskop angebrachte CCD-Kamera („CF4“, Kappa opto-electronics GmbH, Gleichen) ermöglicht es, das Bild statt durch die Okulare auf einem Monitor („WV-5410“, Panasonic Deutschland GmbH, Hamburg) zu betrachten.

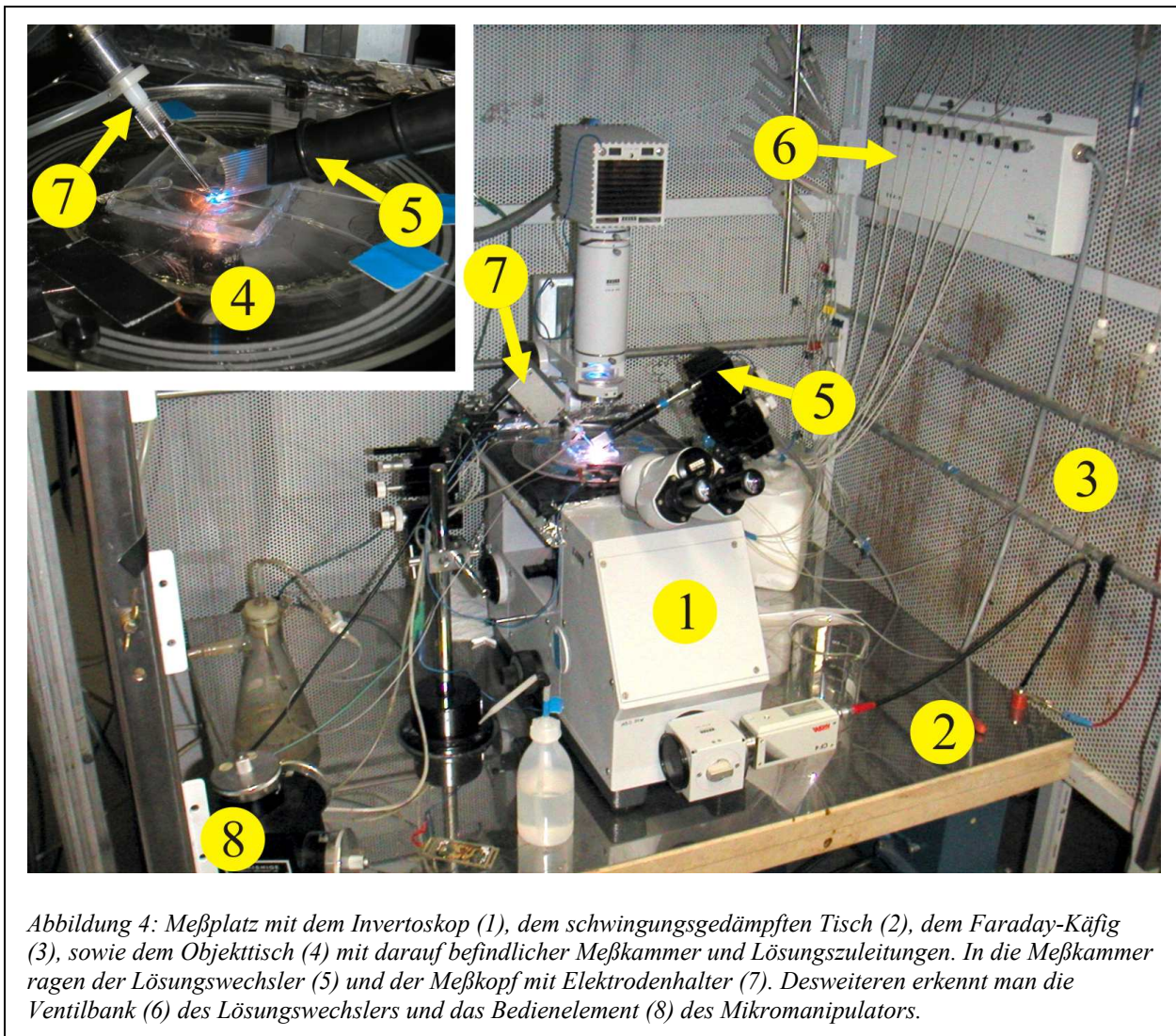


Abbildung 4: Meßplatz mit dem Invertoskop (1), dem schwingungsgedämpften Tisch (2), dem Faraday-Käfig (3), sowie dem Objektisch (4) mit darauf befindlicher Meßkammer und Lösungszuleitungen. In die Meßkammer ragen der Lösungswechsler (5) und der Meßkopf mit Elektrodenhalter (7). Desweiteren erkennt man die Ventilbank (6) des Lösungswechslers und das Bedienelement (8) des Mikromanipulators.

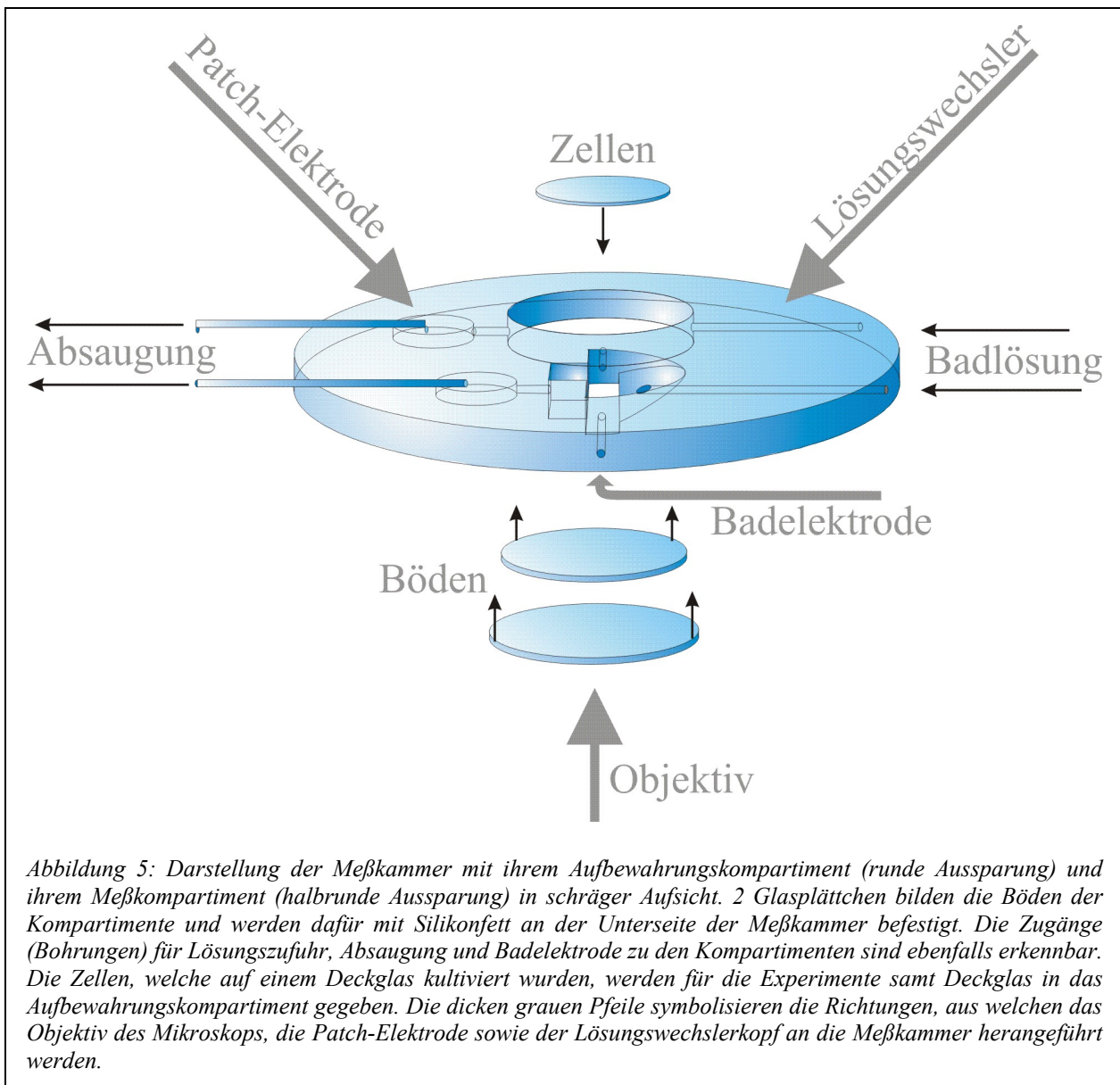
Alle eben beschriebenen Gerätschaften sind von einem Faraday-Käfig umgeben, um sie gegen elektromagnetische Wellen abzuschirmen, und sind über den Verstärker geerdet. In dem Verstärker („EPC9“, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht) ist der elektrische Schaltkreis der Spannungsklemme (II.B.2) realisiert. Der Verstärker ist mit der Probe samt Patch-Elektrode verbunden. Ein Analog-Digital-Wandler, ebenfalls Teil des Verstärkers, dient als Schnittstelle zur Steuerung und Aufnahme über einen Rechner (Targa 800MHz Personal Computer mit Windows Me, Actebis International Distribution GmbH, Soest). Weiterhin ist an den Verstärker noch ein x-t-Schreiber angeschlossen, welcher kontinuierlich die gemessenen Ströme protokolliert. Außerhalb des Faradaykäfigs befindet sich noch die

Steuereinheit des Lösungswechslers, ein Monitor, welcher das Bild der CCD-Kamera wiedergibt, ein Startergerät (VHW 50f-2b, Carl Zeiss, Jena) für die UV-Lampe sowie ein Transformator (Ernst Leitz GmbH, Wetzlar) für die normale Mikroskopbeleuchtung.

II.B.3.b) Meßkammer

Die Meßkammer (Abbildung 5) verfügt über zwei lösungsdurchflossene Kompartimente für Zellen, die durch das Mikroskop beobachtet werden können. Die Kompartimente sind in eine Plexiglasscheibe hineingefräst. Die Böden der Kompartimente bilden Deckgläser („Runde Deckgläser, 20mm Ø, Stärke 0,13mm“, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen), welche mit Nagellack an die Unterseite der Plexiglasscheibe angeklebt sind. Solche dünnen Böden wurden ausgewählt, um den Abstand zwischen Objekt (den Zellen) und Objektiv möglichst gering zu halten, denn die Objektive des Invertoskops, die von unten an die Meßkammer herangeführt werden, erfordern einen Objektabstand von nur wenigen Millimetern.

Ein Kompartiment der Meßkammer, das „Aufbewahrungskompartiment“, dient zur Aufbewahrung der auf einem runden Deckglas befindlichen Zellen (II.A.4) während der Versuche. Es besitzt deshalb einen runden und etwas größeren Querschnitt als das Deckglas mit den Zellen. Das andere Kompartiment, das Meßkompartiment, ist für die Einzelzellmessung mit Lösungswechsel vorgesehen. Es umschließt den Lösungswechsler (II.B.3.i)) möglichst dicht und erlaubt so ein geringes Totvolumen der Lösungen. Beide Kompartimente verfügen über Bohrungen, durch die sie mit der Badlösung (III.A.2.a)) gespült werden. In dem Aufbewahrungskompartiment findet mit Hilfe einer Glaskanüle ein Absaugen der Lösungsoberfläche statt, um am Beginn eines jeden Experiments die Spitze der Patch-Pipette beim Eintauchen nicht zu verschmutzen. Das Meßkompartiment hingegen bedarf einer schockarmen, kontinuierlichen Lösungsabsaugung, die die Eintauchtiefe der Patch-Pipette möglichst nicht verändert. Deshalb wird nicht direkt in dem Meßkompartiment abgesaugt, sondern in einem kleinen Nebenkompartment, das mit dem Meßkompartiment durch eine Bohrung verbunden ist. Eine Badelektrode, durch eine weitere Bohrung in das Meßkompartiment geschoben, erdet dieses, und eine Bohrung zwischen Meß- und Aufbewahrungskompartiment bewirkt, daß auch das letztere geerdet ist.



II.B.3.c) Elektroden und ihre Aufgaben

Im Patch-Clamp-Verfahren (II.B.2) legt man über einen Membranfleckchen oder über die ganze Membran einer Zelle eine bestimmte Potentialdifferenz an, wobei zudem die über die Membran fließenden Ströme gemessen werden sollen. Die Zellmembran ist jedoch immer von ionenhaltigen Lösungen umgeben, so daß das Vorhandensein einer Potentialdifferenz über die Membran auch gleichzeitig impliziert, daß die Lösungen auf beiden Seiten der Membran jeweils auf einem anderen Potential liegen müssen. Um dies zu realisieren werden Elektroden verwendet, die folgende Kriterien erfüllen müssen:

Zwischen den metallischen Leitern, welche sowohl mit der Erde als auch mit dem Verstärker verbunden sind sowie den Lösungen, welche hierbei als Elektrolyte agieren, muß ein

elektrischer Kontakt hergestellt werden. Der elektrische Widerstand des Kontakts muß im Vergleich zum Widerstand der Membran klein sein und sollte unabhängig vom Stromdurchfluß sein. Am Kontakt auftretende Grenzflächenpotentiale müssen klein gegenüber dem aufzuzwingenden Membranpotential sein und sollten sich ebenfalls nicht ändern. Eine Konstanz des Widerstandes und des Grenzflächenpotentials wird ebenfalls für Änderungen in der ionischen Zusammensetzung der Lösungen erfordert.

Weiterhin muß gewährleistet sein, daß die Lösungen auf beiden Seiten der Membran voneinander elektrisch isoliert sind und daß diese Isolierung, sofern sie nicht durch die Membran bewerkstelligt wird, gegenüber der Membran einen wesentlich höheren Widerstand und eine wesentlich geringere Kapazität aufweist.

All diese Forderungen werden im Rahmen der Versuche von der im Folgenden besprochenen Badelektrode und der Patch-Elektrode realisiert.

II.B.3.d) Badelektrode

Die Badelektrode ist jene Elektrode, welche die Aufgabe hat, die Lösung in der Meßkammer (II.B.3.b)) elektrisch zu erden. Die Badelektrode steht mit der Lösung in direktem Kontakt, weshalb Grenzflächenphänomene zwischen der Lösung, welche als Elektrolyt fungiert, und dem Metall der Elektrode auftreten. Um den Einfluß derartiger Phänomene auf die Messungen von Strömen zu minimieren, wurde (in Anbetracht des im folgenden Erläuterten) für den Versuch eine Ag/AgCl-Elektrode verwendet: Das Metall liegt bei dem verwendeten Modell („EP1“, World Precision Instruments, Berlin) zusammen mit dem Metallsalz als gesintertes Material in Form eines Zylinders (3mm x 1mm) vor. An diesem Ag/AgCl-Zylinder ist ein Silberdraht angebracht, welcher eine elektrische Verbindung aus der Meßkammer heraus zur Erde schafft.

Weshalb anstelle einer reinen Metallelektrode eine Metall/Metallsalz-Elektrode verwendet wird, soll im folgenden erläutert werden: Wird eine reine Silberelektrode in eine Lösung getaucht, so lösen sich von dem festen Metall Silberionen unter Abgabe eines Elektron:



Hierdurch baut sich ein elektrisches Potential zwischen Elektrolyt und Metall auf, welches dem chemischen Potential zwischen festem und gelöstem Metall entgegenwirkt und zu einem

elektrochemischen Gleichgewicht der obigen Reaktion führt. Das elektrische Grenzflächenpotential E läßt sich durch folgende Gleichung beschreiben:

$$E = E_o + \frac{R \cdot T}{F} \ln c_{Ag^+} \quad \text{Gleichung 3}$$

E_o hat für Ag/Ag^+ unter Standardbedingungen einen Wert von 0,799V.

Im Falle einer reinen Silberelektrode ist die Konzentration an gelöstem Silber sehr klein, denn sie speist sich lediglich aus dem Prozeß des Herauslösens aus festem Metall. Die Konzentration ist somit starken Schwankungen ausgesetzt, was zu einer Unstabilität des Grenzflächenpotentials führt. Von einer idealen Elektrode erwartet man jedoch ein stabiles Grenzflächenpotential.

Eine Silber/Silberchloridelektrode überträgt die Ladungen zwischen Elektrode und Elektrolyt ebenso wie eine reine Silberelektrode (Gleichung 2); die Konzentration an gelöstem Silber wird jedoch durch die Anwesenheit einer vergleichsweise hohen Chloridkonzentration (mind. Millimolar) vorgegeben, wodurch das Grenzflächenpotential der $Ag/AgCl$ -Elektrode stabilisiert ist. Dieser Zusammenhang zwischen gelöstem Ag^+ und Cl^- soll im folgenden erläutert werden:

Gibt man nämlich das Salz Silberchlorid in Lösung, stellt sich ein Reaktionsgleichgewicht mit folgender Gleichgewichtskonstante K ein:

$$K = \frac{c_{Ag^+} \cdot c_{Cl^-}}{c_{AgCl}} = \text{konstant} \quad \text{Gleichung 4}$$

Jedoch ist $AgCl$ ein schwerlösliches Salz, weshalb beim Lösen des Salzes die Konzentration des gebundenen Salzes c_{AgCl} als konstant betrachtet werden kann. Wendet man diese Bedingung auf Gleichung 4 an, erhält man für das Reaktionsgleichgewicht bei gleichbleibender Temperatur, daß das Produkt aus der Konzentration der gelösten Metallionen c_{Ag^+} und der Chloridkonzentration c_{Cl^-} ebenfalls konstant ist, wobei die Konstante durch das Löslichkeitsprodukt K_L gegeben ist:

$$K_L = c_{Ag^+} \cdot c_{Cl^-} = \text{konstant} \quad \text{Gleichung 5}$$

Setzt man diesen Zusammenhang zwischen der Konzentration an gelöstem Silber und der Chloridkonzentration in Gleichung 3 ein, erhält man:

$$E = E_o^* + \frac{R \cdot T}{F} \ln c_{Cl^-} \quad \text{Gleichung 6}$$

Die Ag/AgCl-Elektrode verhält sich im Vergleich zur reinen Silberelektrode nicht mehr sensitiv zu gelöstem Silber, sondern sensitiv zu Chlorid, weshalb man sie als Chloridelektrode mit folgendem Reaktionsschema betrachten kann:



Die Ag/AgCl-Elektrode zeichnet sich durch eine hohe Reversibilität aus. Im Falle einer vergleichsweise hohen Chloridkonzentration besitzt die Elektrode eine hohe Ladungsträgerkonzentration und dadurch eine schnelle Reaktionszeit bei Umladevorgängen während eines Spannungssprunges. Die auf Grund eines Stromdurchflusses verursachten Änderungen im Grenzflächenpotential sind hierbei vernachlässigbar.

In der Versuchsanordnung besaßen die verschiedenen Lösungen, welche in die Meßkammer (II.B.3.b)) appliziert wurden, gleiche Chloridkonzentrationen (150 mM), so daß das an der Grenzfläche zwischen Ag/AgCl-Elektrode und Elektrolyt ausgebildete Grenzflächenpotential konstant blieb und über den Verstärker abgeglichen werden konnte.

II.B.3.e) Patch-Elektrode

Die Aufgabe der Patch-Elektrode liegt hauptsächlich darin, einen niederohmigen elektrischen Zugang zu einer Seite eines Membranflecks oder der gesamten Zellmembran zu schaffen. Hierfür muß dieser Zugang gegenüber der geerdeten Lösung der Meßkammer hochohmig isoliert sein. Es hat sich bewährt, als isolierende Hülle der Patch-Elektrode eine dickwandige Glaskapillare zu verwenden, welche eine geringere elektrische Kapazität aufweist als eine dünnwandige. Die Glaskapillare wird zu diesem Zwecke mit Hilfe eines Kapillarziehgerätes und einer Mikroschmiede in die Form einer Pipette gezogen. Diese Patch-Pipette besitzt nun an ihrem einen Ende eine ausgezogene Spitze mit einem Spitzendurchmesser im Bereich von einigen μm . Diese kleinen Spitzendurchmesser sind notwendig, da die Größe der zu

messenden CHO-Zellen im Bereich von 20 μm liegt. Die Patch-Pipette wird mit einer entsprechenden Pipetten-Lösung befüllt, welche in diesem Versuchsaufbau während eines Experiments mit einer Zelle nicht geändert wird. Um einen elektrischen Kontakt zwischen der Pipettenlösung und den metallischen Leitern, welche mit dem Verstärker verbunden sind, herzustellen, wurde ebenfalls eine Ag/AgCl-Elektrode gewählt, die nach dem gleichen Prinzip wie auch die Badelektrode aufgebaut ist. Jedoch besitzt dieses Modell („EP05“, World Precision Instruments, Berlin) der Elektrode eine andere Zylinderform (0,5mm \varnothing , 2cm lang) als die Badelektrode, damit sie in die Patch-Pipette hineinpaßt. Die Ag/AgCl-Elektrode ist fest in einem Elektrodenhalter aus Kunststoff (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht) verankert. Für jedes Experiment muß eine neue, mit Lösung befüllte Patch-Pipette über die Ag/AgCl-Elektrode gestülpt und im Elektrodenhalter befestigt werden. Eine Öffnung des Elektrodenhalters, der die Pipette ansonsten luftdicht umschließt, dient dazu, den Druck in der Pipette vorzugeben. Dies geschieht mit Hilfe einer Injektionsspritze zur Druckapplikation und einem mit Wasser gefüllten U-Rohr aus Glas zur Druckmessung, die beide über einen Silikonschlauch mit der Öffnung des Elektrodenhalters verbunden sind. Durch eine Vorgehensweise, wie sie im Kapitel II.B.3.g) beschrieben ist, wird für eine Messung die CHO-Zelle an die Spitze der Patch-Pipette gesaugt. Daraufhin haftet der Rand der Spitzenöffnung mit der Zellmembran derart zusammen, daß sich hier ein elektrischer Widerstand in der Größe von einigen $\text{G}\Omega$ ausbilden kann. Eine geeignete Isolierung gegenüber der Lösung in der Meßkammer ist damit gewährleistet. Bricht man den durch die Spitzenöffnung umschriebenen Membranfleck auf, wie es im Kapitel II.B.3.h) erläutert ist, dann erhält man einen elektrischen Zugang zum Zellinneren und kann so die ganze Zellmembran auf die gewünschte Potentialdifferenz klemmen. Außerdem definiert man dadurch die intrazelluläre Lösung der Zelle, welche durch die Pipettenlösung vorgegeben wird.

II.B.3.f) Herstellung der Patch-Pipette

Für ein neues Experiment wird an der Patch-Elektrode lediglich die Patch-Pipette samt Elektrolyt ausgetauscht; die Ag/AgCl-Elektrode verbleibt hingegen an dem Elektrodenhalter. Der Austausch der Pipette ist notwendig, da sie nach einmaligem Kontakt mit der Membran verschmutzt ist und kein zweites Mal verwendet werden kann. Die Patch-Pipette wird aus einer dickwandigen Borosilikatglaskapillare ($\varnothing_a = 1,5 \text{ mm}$, $\varnothing_i = 0,87 \text{ mm}$) (Hilgenberg, Malsfeld) hergestellt. Die Kapillaren werden mit einem Diamantschneider (Institutseigenbau)

auf eine Länge von ca. 8 cm geschnitten. Danach werden sie einzeln in ein vertikal ziehendes Kapillarziehgerät („PP-83“, Bachofer, Reutlingen) eingespannt, welches die Kapillaren mit Hilfe einer Heizwendel mittig anheizt, mit einem Gewicht in die Länge zieht, und auseinanderreißt. Aus jeder Kapillare erhält man so zwei Patch-Pipetten mit Spitzenöffnungen im μm -Bereich. Das Kapillarziehgerät besitzt einen zweistufigen, einstellbaren Heiz- und Ziehmechanismus. Hiermit kann man gezielt sowohl die Form der Pipette als auch die Öffnung der Spitze einigermaßen reproduzierbar gestalten.

Die Spitze der Patch-Pipette wird nachträglich mit der Mikroschmiede bearbeitet. Die Mikroschmiede besitzt einen dünnen Platindraht, auf dem Weichglas mit einer niedrigeren Schmelztemperatur als sie das Borosilikatglas der Kapillaren aufweist, aufgeschmolzen ist. Der Platindraht ist an eine Spannungsquelle angeschlossen, so daß die Temperatur des Drahtes reguliert werden kann. Weiterhin befindet sich ein Manipulator an der Mikroschmiede, der es erlaubt, eine auf ihm eingespannte Patch-Pipette mit ihrer Spitze präzise an den Platindraht heranzuführen. Durch ein Mikroskop wird der ganze Vorgang in der Mikroschmiede betrachtet:

Man führt die Spitze der Patch-Pipette an den zunächst noch kalten Weichglastropfen am Platindraht. Dann heizt man den Platindraht soweit auf, daß der Tropfen anschmilzt und in die Spitze der Pipette gesogen wird. Die Pipette schmilzt hierbei auf Grund ihrer höheren Schmelztemperatur nicht an. Wie weit das Weichglas in die Spitze hineinfließt, läßt sich durch den Abbruch des Heizvorgangs steuern. Sobald das Weichglas erkaltet, zieht es sich zurück und bricht dabei die Spitze der Patch-Pipette an genau der Stelle ab, bis zu der das Weichglas hineingeflossen war. Mit Hilfe dieses Verfahrens läßt sich die Spitzenöffnung auf $1\mu\text{m}$ genau präparieren. Indem man den Platindraht bei einer größeren Entfernung zur Spitze höher aufheizt, so daß der Tropfen gerade weit genug entfernt ist, um nicht die Spitze zu berühren, wird die Bruchstelle der Spitze durch Anschmelzen abgerundet. Dies erhöht wesentlich den elektrischen Widerstand der darauffolgenden Verbindung zwischen Glas und Membran und beschleunigt auch den Vorgang des Verbindens.

Die Patch-Pipetten wurden möglichst zeitnah zum Experiment hergestellt, um einer Verschmutzung der Spitzen vorzubeugen.

Die Pipette wird kurz vor dem Experiment mit der Pipettenlösung befüllt. Hierzu wurde in unserem Falle eine Injektionsspritze („Omifix 10ml“, Braun Melsungen) mit einem $45\mu\text{m}$ - Porenfilter („Filtropur S 0,45“, Sarstedt, Nümbrecht) und einer biegsamen $164\mu\text{m}$ dünnen Nadel („MicroFil MF34G“, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA) verwandt.

II.B.3.g) Versuchsdurchführung

Die zu untersuchenden CHO-Zellen, welche mit dem Wild-Typ des mGAT1 bzw. dessen N-Glykosilierungsmutanten transfiziert wurden, befinden sich zum Tag des Experimentes auf runden Glasplättchen, auf denen sie adhärieren (siehe hierzu II.A.4). Jedes Glasplättchen mitsamt den Zellen liegt zum Zwecke der Aufbewahrung in einer Vertiefung der mit Alpha-Medium gefüllten 24-Well-Kulturschalen („Nunclo-Multischalen“, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) bei 36 °C und 5 % CO₂. Für die Experimente wird jeweils ein Glasplättchen samt Zellen in die Meßkammer gelegt, und zwar in das Aufbewahrungskompartiment, welches einen etwas größeren Radius als das Plättchen hat. Die Meßkammer wird hierbei mit der Badlösung durchspült. Mithilfe des Invertoskops, dessen Objektive sich unterhalb der Meßkammer befinden, werden die Zellen nun durch den Meßkammerboden und das Glasplättchen hindurch betrachtet. Der Strahlengang des die Fluoreszenz anregenden blauen Lichtes wird nun durch das Objektiv zu den Zellen geleitet. Die Auswahl der Zellen erfolgt bei geeigneter Abdunklung störender Lichtquellen nach der Größe der Fluoreszenzintensität und im weiteren nach der Glätte der Zelloberfläche. Nachdem eine gefüllte Patch-Pipette auf den Elektrodenhalter gespannt wurde, wird in der Patch-Elektrode ein Überdruck von etwa 4 mm/Hg-Säule angelegt, der einer Verschmutzung der Pipettenspitze innerhalb der Meßkammer vorbeugen soll. Aus eben diesem Grund wird auch die Oberfläche der sich im Aufbewahrungskompartiment der Kammer befindlichen Lösung abgesaugt, bevor die Patch-Elektrode hineingetaucht wird. Nach dem Eintauchen positioniert man die Pipettenspitze der Patch-Elektrode mit Hilfe eines Mikromanipulators direkt über die ausgesuchte Zelle. Dies ist der Moment, an dem das Potential auf den Wert Null abgeglichen wird und sämtliche bereits auftretende Kapazitäten kompensiert werden, wie z.B. die der eintauchenden Pipettenoberfläche. Durch Testpulse des Verstärkers wird der Widerstand der Patch-Elektrode mit der offenen Spitze bestimmt. Er sollte wesentlich kleiner sein, als der Widerstand, welcher sich bei der Anhaftung der Membran an die Spitze ausbildet. Im Experiment lag er gewöhnlich bei Werten von 2 bis 3 MΩ. Vorsichtig wird die Spitze auf die Zelle gedrückt, wobei nun ein leichter Unterdruck von etwa 7 mm/Hg-Säule angelegt wird. Durch diesen Unterdruck findet eine schnelle Verbindung zwischen Glas und Membran statt, die den elektrischen Widerstand bis in den GΩ-Bereich ansteigen läßt. Leichtes Hin- und Herbewegen löst die Zelle vom Glasboden ab, so daß sie nun allein an der Spitze der Patch-Pipette hängt und sich durch ein Überschwemmen der Meßkammer mit samt der Pipette in das Meßkompartiment vor den Lösungswechsler positionieren läßt. Die Absaugung wird

umgestellt, um, während man die Messungen durchführt und die Lösungen wechselt, einen laminaren Lösungsstrom im Meßkompartiment zu gewährleisten.

Die geschilderte Prozedur des Ansaugens der Zelle bis zum Lösungswechsel ist durchaus kein einfaches Unterfangen und führt nur allzuoft zum Mißerfolg. Häufig haftet die Zelle zu sehr am Boden, wodurch sie sich nicht oder nur bei Beschädigung der Membran ablösen läßt. Im Lösungswechsler bilden sich nicht selten Luftblasen, die beim Herausströmen aus dem Wechsler die Zelle von der Patch-Pipette reißen. Und glückt es einem einmal, die Zelle unter verschiedenen Lösungen zu messen, stellt sich heraus, daß der Transportstrom zu gering ist, um die Messung verwerten zu können, denn die intensive Fluoreszenz ist nicht unbedingt ein Garant für eine starke Transporterexpression in der Zellmembran. Transporter im Zytosol tragen auch zur Fluoreszenz bei und sind nur schwer von membranständigen zu unterscheiden.

Die Zellen eines Glasplättchens wurden nicht länger als 2 Stunden für Messungen verwendet, nachdem sie dem Kulturmilieu entnommen wurden, weil sich ihre Qualität mit der Zeit zunehmend verschlechterte.

II.B.3.h) Verwendete Konfigurationen des Patch

Durch Ansaugen der Zelle an die Patch-Pipette entsteht eine hochohmige Verbindung (im $G\Omega$ -Bereich) zwischen der Membran und dem Borosilikatglas. Laut Corey und Stevens [1983] sind als Ursache für die Verbindung mit einem Zwischenraum von weniger als 10 Å vier verschiedene Phänomene in Betracht zu ziehen. Als erstes könnten Ionenbindungen zwischen den positiven Ladungen der Membran und den negativen Ladungen der Glasoberfläche vorliegen, zum zweiten kämen Wasserstoffbrücken zwischen den Stickstoff- oder Sauerstoffatomen der Phospholipide und den Sauerstoffatomen des Glases in Betracht. Zum dritten kommt das Phänomen einer Interaktion zweiwertiger Ionen, wie Ca^{2+} , welche Salzbrücken mit negativ geladenen Gruppen der Glasoberfläche und der Membran bilden könnten, in Frage. Zuletzt ist zu bedenken, daß der nahe Abstand zwischen Membran und Glas zu van-der-Waals Kräften führen kann. Wahrscheinlich tragen alle vier Phänomene im Zusammenspiel zu der Verbindung bei.

Nachdem die Verbindung zwischen Glas und Membran zustande gekommen ist, herrscht die sog. „cell-attached“-Konfiguration vor. Diese Konfiguration erlaubt es, den Membranfleck der intakten Zelle, welcher in der Spitze der Patch-Pipette sitzt, auf ein Potential zu klemmen. Das angelegte Potential teilt sich bei dieser Konfiguration jedoch sowohl auf den Widerstand

des Membranflecken als auch auf den Widerstand der restlichen Zellmembran auf, da die Widerstände hierbei in Reihe geschaltet sind. Weil jedoch das Verhältnis dieser Widerstände zueinander unbekannt ist, läßt sich nicht ermitteln, welcher Anteil des angelegten Potentials am Membranflecken abfällt. Zudem besitzt die intakte Zelle ein in der „cell-attached“-Konfiguration nicht zu ermittelndes Ruhepotential, welches sich dem angelegten Potential überlagert.

Durch einen elektrischen Spannungspuls oder eine kurzzeitige Erhöhung des Pipettenunterdrucks kann man, ausgehend von der „cell-attached“-Konfiguration, eine Zerstörung des Membranflecken erreichen. Wenn dies vorsichtig genug geschieht, leidet die Verbindung zwischen dem Rand der Spitzenöffnung der Patch-Pipette und der Membran nicht unter diesem Verfahren. Man erhält so einen direkten elektrischen Zugang in die Zelle und kann die ganze Zellmembran auf das angelegte Potential der Spannungsklemme bringen. Man spricht hierbei deshalb von der „whole-cell“-Konfiguration, deren großer Vorteil gegenüber der „cell-attached“-Konfiguration darin besteht, daß man das elektrische Potential der Membran genau kennt. Das Zytosol der Zelle wird in dieser Konfiguration durch die Pipettenlösung ausgetauscht. Um den Membranflecken zur Schaffung der Konfiguration zu zerstören, wurde eine Kombination aus Spannungspuls (400mV für 100ms) und Druckapplikation gewählt. Jedoch wurde dabei nur allzuoft die ganze Zelle zerstört. Für die „whole-cell“-Konfiguration ist eine Abwesenheit von Kalzium in der Pipette notwendig, damit sich der Membranfleck nicht wieder schließt. Darum beinhaltete die Pipettenlösung von zweiwertigen Ionen lediglich Magnesium und den Kalzium-Komplexbildner EGTA (Ethylenglykol-bis(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure).

Nach der „whole-cell“-Konfiguration wurde die Zelle von dem Boden der Meßkammer abgelöst. Die Kompensationsvorrichtung des Verstärkers erlaubte es, die Kapazität der Membran und den Widerstand der Pipettenspitze, den sog. Serienwiderstand, zu bestimmen. Ein Serienwiderstand von mehr als 10M Ω bedeutet im Falle der CHO-Zellen, daß der Membranfleck nicht ausreichend zerstört wurde und somit teilweise die Spitze verschließt.

Weiterhin gibt es Konfigurationen, welche Messungen an von der Zelle abgetrennten Membranflecken ermöglichen (dies soll hier jedoch nicht im näheren besprochen werden). Die „whole-cell“-Konfiguration wurde für die Experimente gewählt, weil sie gegenüber diesen anderen Konfigurationen die größtmögliche Membranoberfläche bietet. Damit war auch ein größtmögliches Stromsignal gewährleistet, denn dieses steigt proportional zur Größe der Oberfläche an. Ein schwerwiegendes Problem bestand nämlich zuvor darin, daß die mit

mGAT1 exprimierten Zellen ein nur sehr kleines Stromsignal bei ungünstigem Signal/Rausch-Verhältnis geliefert hatten.

II.B.3.i) Lösungswechsel

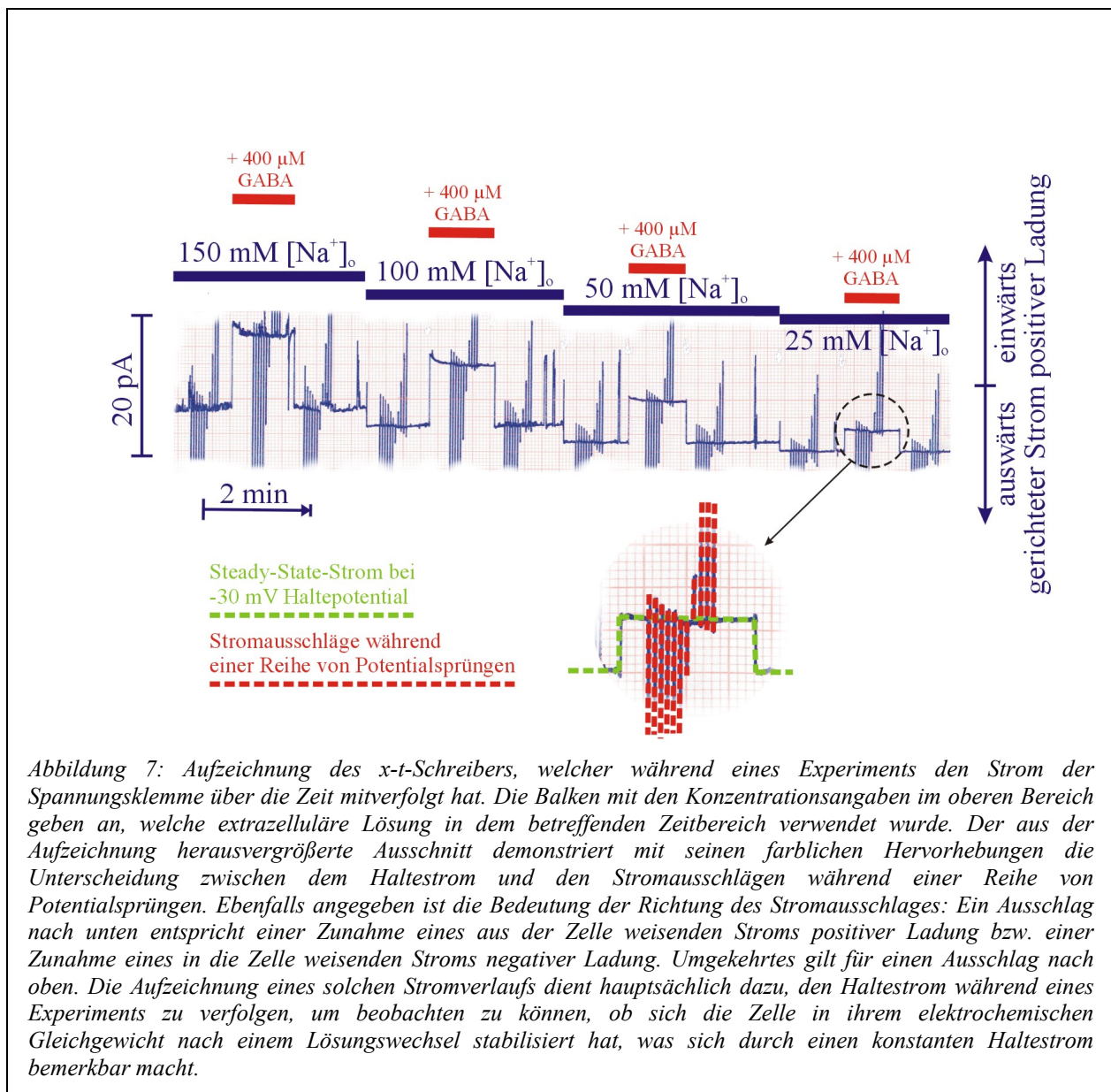
Einer der Vorteile des Patch-Clamp-Verfahrens mit seinen kleinen Zellen, bzw. kleinen Membranfragmenten besteht gegenüber dem Two-Electrode-Voltage-Clamp-Verfahren (II.B.1), welches große Zellen verwendet darin, wesentlich schnellere Lösungswechsel durchführen zu können. Der Grund hierfür liegt in der wesentlich kleineren Membranoberfläche.



Abbildung 6: Kopfstück des verwendeten Lösungswechslers („RSC-200, Rapid Solution Changer“, Bio-Logic Co., Claix, Frankreich). Die Frontansicht (links) sowie die Seitenansicht (rechts) zeigen die um die Achse angeordneten Glaskapillaren. Die hier gezeigten Abbildungen basieren auf Photographien aus der Internetpräsenz des Herstellers.

Im hier benutzten Meßstand findet der Lösungswechsler RSC 200 (Bio-Logic Co., Claix, Frankreich) Verwendung. Das Kopfstück des Lösungswechslers (Abbildung 6) wird hierbei während des Experiments in das mit Badlösung (III.A.2.a)) durchspülte Meßkompartiment der Meßkammer getaucht, in welchem sich auch die zu untersuchende Zelle aufhält. Das Kopfstück besteht aus vielen Glaskapillaren, aus denen unterschiedliche Lösungen herausfließen. Die Lösungsaustrittsöffnung jeder Glaskapillare kann exakt vor die Zelle positioniert werden, wodurch die Zelle nur von dem laminaren Lösungsstrom dieser Kapillare umspült wird. Eine andere Kapillare kann innerhalb von 2ms vor die Zelle neu positioniert werden, was einen Lösungswechsel im 10ms-Bereich bewirkt. Ein derart konzipierter Lösungswechsler hat den Vorteil, daß er ohne störendes Totvolumen arbeitet. Die

Glaskapillaren ($\varnothing_a = 1 \text{ mm}$, $\varnothing_i = 0,78 \text{ mm}$) des Kopfstücks sind alle parallel zueinander um die Achse eines drehbaren Kunststoffstiftes angeordnet und an diesem Stift befestigt. Der Stift selbst läßt sich zum Zwecke der Kapillarpositionierung mit Hilfe eines Schrittmotors um seine Achse drehen. Die Lösungen befinden sich zur Aufbewahrung in 50ml-Spritzen und werden durch eine Reihe von Schläuchen an die Kapillare herangeführt; der hydrostatische Druck bestimmt hierbei die Fließgeschwindigkeit. An den Schläuchen sind Magnetventile angebracht mit denen der Lösungsfluß jeder Lösung unterbrochen werden kann. Sowohl der Schrittmotor als auch die Ventile werden automatisiert vom Steuerelement des RSC 200 angesteuert und koordinieren so den Lösungswechsel für die Experimente.



Ob sich das zu messende Zellsystem nach dem Lösungswechsel stabilisiert hat, läßt sich durch Beobachtung des sog. Haltestroms verfolgen. Als Haltestrom wird jener Strom bezeichnet, welcher bei einem konstanten Haltepotential von hier -30 mV kontinuierlich

durch einen x-t-Schreiber („Recorder 2200S“, Glould, Cleveland, Ohio, USA) aufgezeichnet wird. Dieser Strom ist bei einem elektrochemischen Gleichgewicht des Zellsystems konstant und ändert sich, sobald das Gleichgewicht gestört wird. Messungen werden nur durchgeführt, wenn das Zellsystem sich im elektrochemischen Gleichgewicht befindet, damit eine Reproduzierbarkeit der Messungen gewährleistet ist. Deshalb ist es unabdingbar, während des gesamten Experiments den Haltestrom über die Registrierung des x-t-Schreibers zu verfolgen, eben um zu entscheiden, wann die jeweilige Messung gestartet werden kann bzw. beendet werden muß. Eine entsprechende Registrierung ist in Abbildung 7 dargestellt und erläutert.

Es zeigt sich oft, daß während eines Experiments die unspezifische Leitfähigkeit der Zellmembran sich mit der Zeit erhöhen oder vermindern kann. Auch dieses Phänomen läßt sich durch Beobachtung der Haltestromaufzeichnung auf der Schreiberregistrierung mitverfolgen.

II.C. Aufnahme und Analyse der Meßdaten

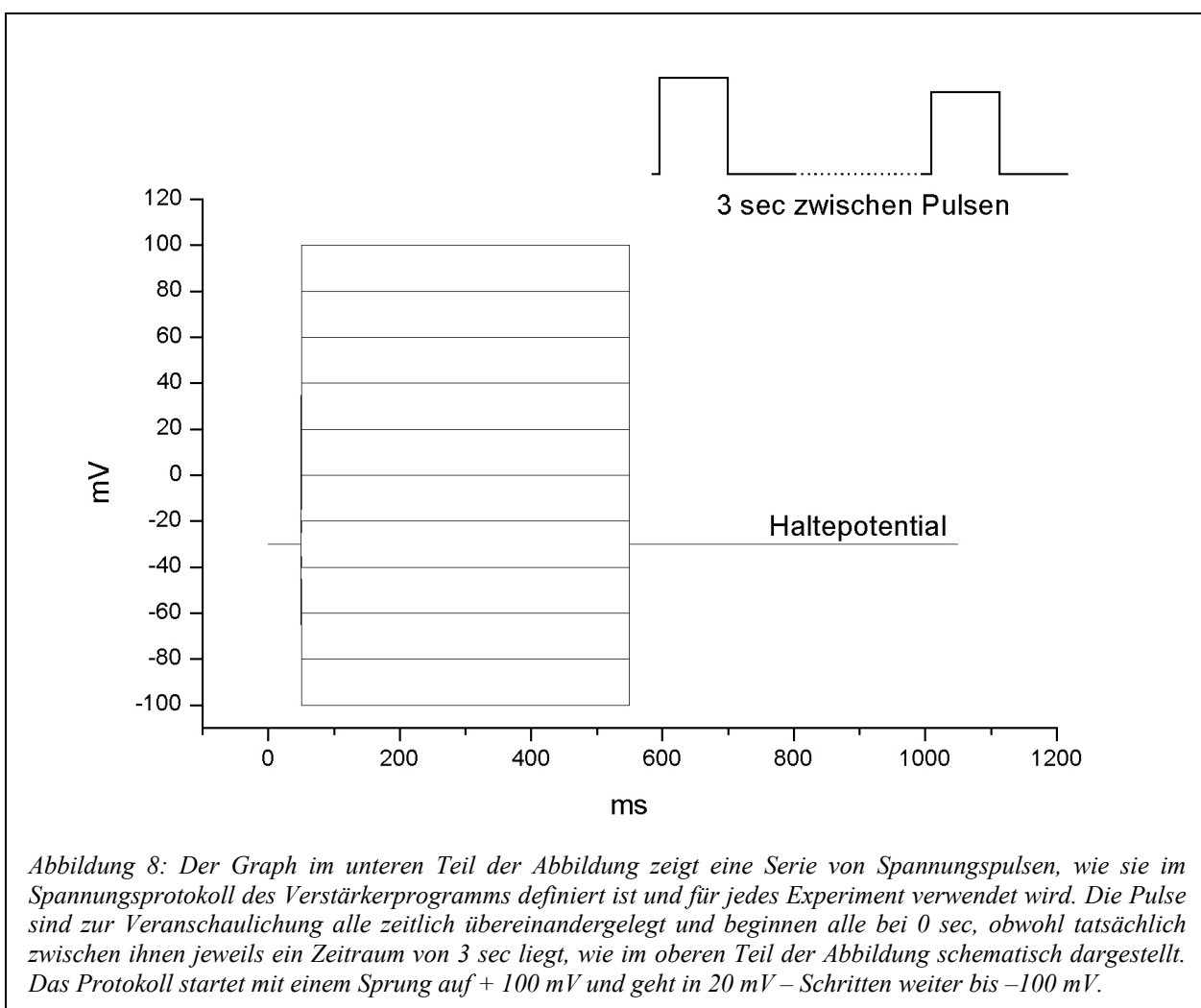
II.C.1. Aufnahme von Strömen

Um die Transportcharakteristika des GABA-Transporters mit elektrophysiologischen Methoden zu bestimmen, untersucht man den Transport nicht nur bei einem einzigen über die Membran angelegten Potential, sondern bei verschiedenen Potentialen. Zum einen kann so eine Strom/Spannungs-Abhängigkeit des Transportstroms ermittelt werden, zum anderen treten durch einen Potentialsprung und in Abwesenheit von GABA exponentiell abklingende Ladungsverschiebungen auf (IV.C), deren Potentialabhängigkeit ebenfalls untersucht werden soll.

Die Potentialsprünge, die der Verstärker während des Experiments der Zelle aufzwingt, werden im Spannungsprotokoll des den Verstärker steuernden Programms vordefiniert. Dieses Spannungsprotokoll wird für jede Lösung komplett durchlaufen und ist unter Berücksichtigung folgender Erwägungen erstellt:

Für die CHO-Zellen können Potentiale mit Werten von +100 mV bis -100 mV gewählt werden; extremere Potentialwerte würden die Zellen zerstören. Ein kontinuierliches Durchlaufen des Potentialbereiches (z.B. in Form einer Rampe) wäre aus vielerlei Gründen nicht zweckmäßig. Man wüßte weder, ob die Zelle während des Durchlaufs sich im elektrochemischen Gleichgewicht befindet, noch könnte man die oben dargelegten Ladungsverschiebungen verfolgen, welche auftreten, solange die Zelle sich nach einem

Potentialsprung noch nicht im Gleichgewicht befindet. Der Potentialbereich wird deshalb schrittweise mit Pulsen durchlaufen (Abbildung 8), wobei die Schrittgröße 20 mV beträgt. Eine kleinere Schrittgröße und somit Messungen bei einer größeren Anzahl von Potentialen würde die Meßdauer des Experiments zu sehr erhöhen. Die Meßdauer sollte aber prinzipiell möglichst klein gehalten werden (erfahrungsgemäß kleiner als 10 min), weil die Wahrscheinlichkeit, daß die zu untersuchende Zelle zerstört wird, mit der Zeit steigt (z.B. durch Luftblasen im Lösungswechsler oder die mechanische Belastung der Zellmembran). Da nach jedem Potentialwechsel der gemessene Strom einen zeitlich exponentiellen Abfall aufweist, muß ein Aufzeichnen des Stroms bis zum Erreichen des Gleichgewichts gewährleistet sein. Es zeigt sich im Experiment, daß hierfür Zeiten von 500 ms ausreichend sind.



Das Spannungsprotokoll ist deshalb wie folgt definiert: Die Potentialänderungen sind ausgehend von einem Haltepotential bei –30 mV als Rechteckpulse gestaltet. Ein Puls hat bei einem Haltepotential einen Vorlauf von 50 ms. Danach folgt der Sprung auf ein anderes

Potential, welches für einen Zeitraum von 500 ms gehalten wird, um danach für weitere 500 ms auf das Haltepotential zurückzuspringen; hier endet der Puls (siehe Abbildung 8). Das durch den Strom, der während eines Pulses fließt, entstehende analoge Signal wird vom Verstärker mit einem Tiefpaßfilter von 1 kHz gefiltert. Anschließend wird es über den Analog-Digital-Wandler im Verstärker mit einer Abtastrate von 2 kHz in ein digitales Signal umgewandelt und vom angeschlossenen Rechner aufgezeichnet. Das Spannungsprotokoll schreibt insgesamt 11 Pulse vor, wobei der erste bei +100 mV einsetzt, die folgenden jedes Mal um 20 mV reduziert sind und der letzte bei -100 mV liegt. Zwischen zwei Pulsen wird die Zelle für 3 sec auf dem Haltepotential gehalten, so daß sie sich regenerieren kann und durch die extremen und langanhaltenden Potentiale nicht zerstört wird.

II.C.2. Auswertung der gemessenen Stromverläufe

Während der Zeit, in der ein Spannungspuls des im vorherigen Kapitel definierten Spannungsprotokolls abläuft, finden zwei Spannungssprünge statt. Nach jedem dieser Sprünge wird die Zellmembran für 500ms auf konstantem Potential gehalten. Betrachtet man den nach einem solchen Sprung gemessenen Strom (Abbildung 9) über den Zeitraum von 500 ms, so läßt er sich als Summe verschiedener Ströme beschreiben, die hier als „Stromkomponenten“ des gemessenen Stroms bezeichnet werden sollen. Dabei ist die Ursache für das Auftreten jeder einzelnen dieser Stromkomponenten verschieden.

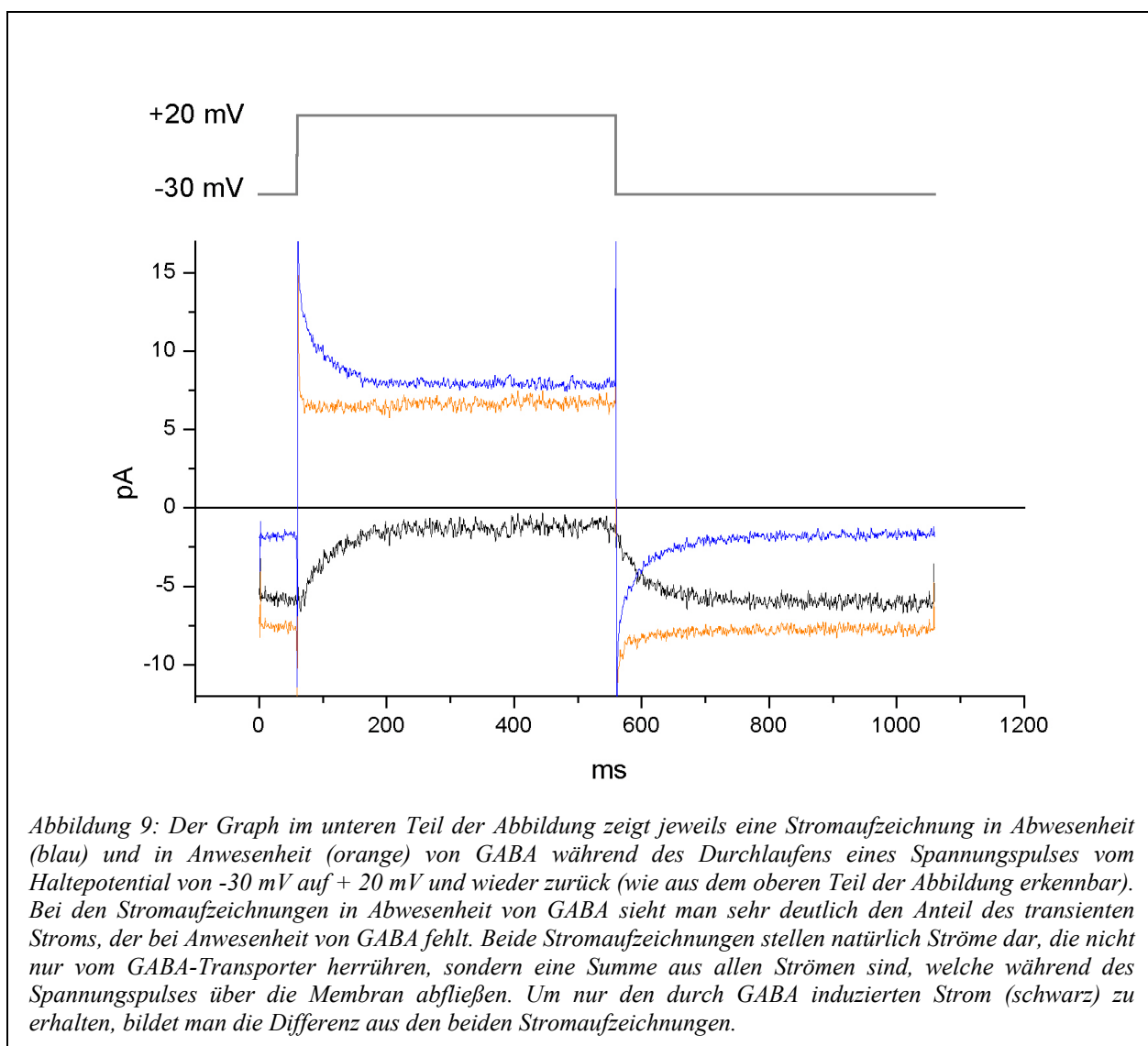
Die Stromkomponenten lassen sich in mehrere zeitabhängige, mit exponentiell abfallendem Verhalten und eine zeitunabhängige unterteilen. Letztere entspricht genau demjenigen Strom, welcher auf Grund der Membranleitfähigkeit über die Membran fließt, wenn zwischen Lösungen und Zellmembran ein elektrochemisches Gleichgewicht herrscht und wird deshalb im allgemeinen als „Steady-State-Strom“ bezeichnet.

Die Ursachen für das Auftreten zeitabhängiger Stromkomponenten liegt in kapazitiven Aufladevorgängen. Unterschiedliche Kapazitäten, welche jeweils eine Stromkomponente mit einer anderen Zeitkonstanten liefern, kommen hier zum Tragen.

Die Oberfläche der Zelle selbst bildet die größte Kapazität mit Werten von rund 20pF. Eine wesentlich geringere Kapazität wird durch die in die Lösung eintauchende Wandung der Patch-Pipette hervorgerufen. Wie bereits (II.B.3.e)) erwähnt, wird für die Pipette ein möglichst dickwandiges Borosilikatglas gewählt, um die Kapazität der Pipettenwandung gering zu halten, denn diese Kapazität schwankt mit der Eintauchtiefe der Pipette. Für die kapazitiven und zeitabhängigen Stromkomponenten der bisher genannten Kapazitäten bietet

der Verstärker EPC9 die Möglichkeit der Stromkompensation, so daß rechnergestützt und durch interne Protokolle automatisiert diese Stromkomponenten vollständig kompensiert werden können. Hierbei wird sowohl die Kapazität der Zelle als auch der Widerstand der Pipettenöffnung (Serienwiderstand) errechnet und angezeigt.

Die für die Messung wesentliche Kapazität jedoch kommt durch die in der Membran exprimierten mGAT1-Proteine zustande, allerdings nur bei extrazellulärer Abwesenheit von GABA [Mager *et al.* 1993]. Stromkomponenten, die die Aufladung dieser Kapazität mit einer Größenordnung von 1pF bewerkstelligen, werden als „transiente Ströme“ bezeichnet und haben Zeitkonstanten im Bereich von 50ms.



II.C.2.a) Auswertung von Steady-State-Stromverläufen

Für die Auswertung von potentialabhängigen GABA induzierten Transportstromverläufen, gewonnen aus mit mGAT1 bzw. deren Mutanten transfizierten CHO-Zellen, wird zunächst die Differenz aus den in An- und den in Abwesenheit von GABA aufgezeichneten Strömen gebildet (Abbildung 9).

Zur Differenzbildung werden Strommessungen bei gleicher extrazellulärer Natriumkonzentration herangezogen. Für jede der vier Natriumkonzentrationen (25, 50, 100 und 150 mM) ist jeweils eine Meßreihe anhand des Spannungsprotokolls (II.C.1) vor und während der 400 μ M GABA-Zugabe sowie auch nach dem Wiederauswaschen von GABA durchzuführen (Abbildung 7), wobei der Zeitraum zwischen diesen Messungen etwa gleich groß sein sollte. Durch Mittelung der Ströme vor der GABA-Zugabe und nach dem Auswaschen von GABA wird so der Effekt (Drift des Haltestroms) einer etwaigen kontinuierlichen Änderung einer unspezifischen Membranleitfähigkeit korrigiert.

Die Differenzbildung gestaltet sich nun derart, daß bei jeweils gleichen Spannungspulsen die Ströme in Anwesenheit von GABA von den korrigierten Strömen in Abwesenheit von GABA subtrahiert werden. Da die während einer Messung aufgezeichneten Ströme der Zelle ihrer Ursache nach nicht nur durch den GABA-Transporter verursacht werden, sondern eine Summe aller über die Membran fließenden Ströme darstellen, erhält man auf Grund der oben beschriebenen Rechenoperation den lediglich durch GABA induzierten Strom, welcher folglich keine Komponenten mehr enthält, die nicht durch GABA verursacht sind.

Um aus einer derartigen Differenzbildung darauf zu schließen zu können, daß das durch GABA induzierte Stromsignal dem Transportstrom des mGAT1-Proteins zuzuschreiben ist, muß man voraussetzen, daß das GABA lediglich auf den Transportmechanismus des mGAT1 wirkt und zwar direkt. Durch Vergleichsmessungen an nicht-transfizierten Zellen konnten keinerlei GABA-induzierte Ströme nachgewiesen werden, wodurch ein endogener GABA-Transporter der CHO-Zellen ausgeschlossen werden kann.

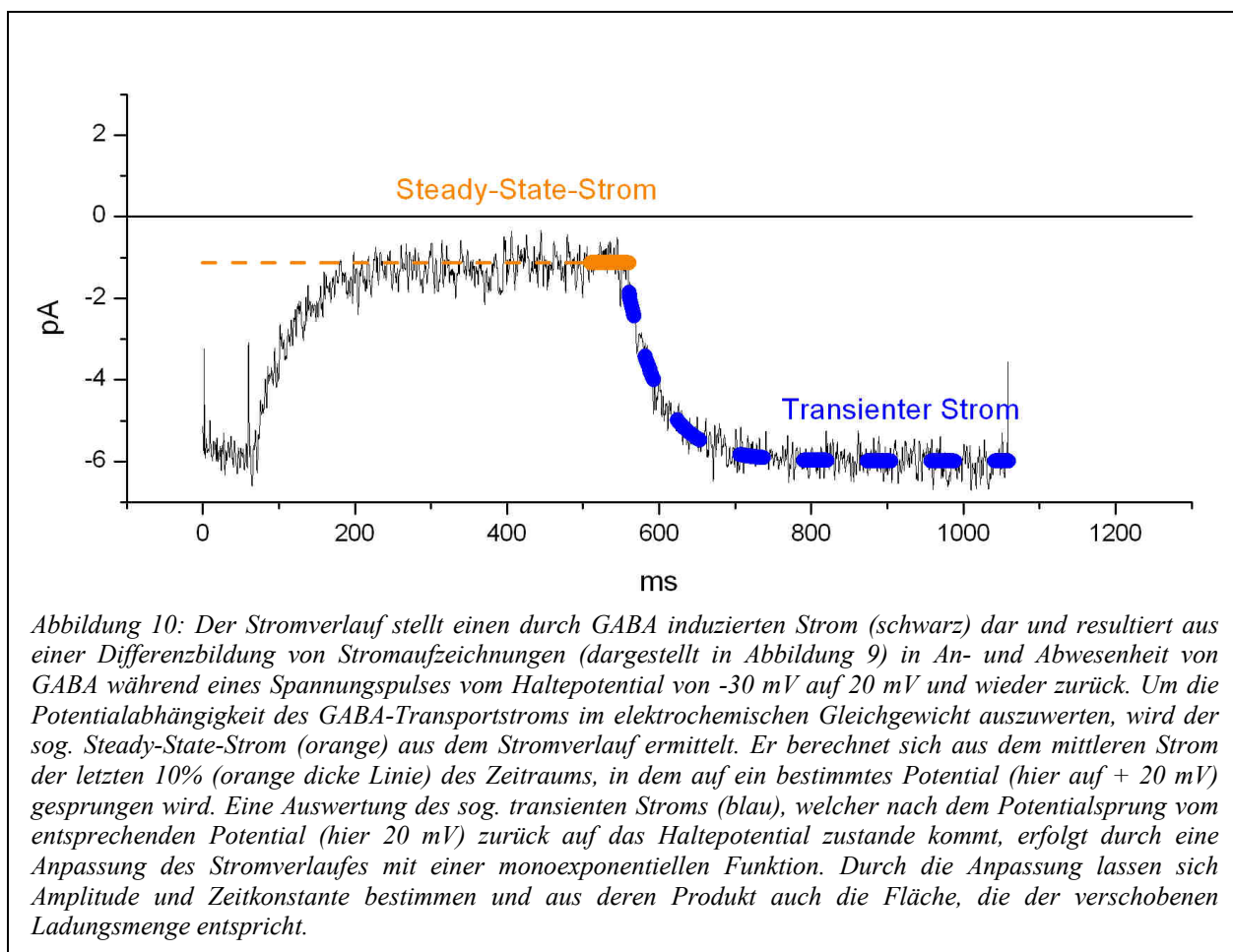
Betrachtet man bei den resultierenden Strömen die zeitunabhängige Komponente, also den Steady-State-Strom, so entspricht er eben diesem nur durch GABA induzierten Strom, solange die Zelle sich im elektrochemischen Gleichgewicht befindet. Da der durch GABA induzierte Strom in den letzten 10% eines Zeitraumes (500 ms), die nach einem Potentialsprung folgen, kein zeitabhängiges Verhalten mehr aufweist, wird über diese 10% der Strom gemittelt, um den Steady-State-Strom zu erhalten (dargestellt in Abbildung 10).

II.C.2.b) Auswertung transienter Stromverläufe

Da transiente Ströme nur in Abwesenheit von GABA in mGAT1-exprimierenden Zellen gemessen werden, nicht jedoch in deren Anwesenheit, werden sie ebenfalls als Stromkomponente in den durch GABA induzierten Strömen vorkommen, die nach einer im vorherigen Kapitel beschriebenen Differenzbildung aus Stromaufzeichnungen ermittelt werden, allerdings mit umgekehrtem Vorzeichen. Diese transienten Ströme zeigen ein monoexponentielles Verhalten und werden deshalb zur Analyse mit folgender Funktion angepaßt:

$$I(t) = I_{amp} \cdot e^{\frac{-(t-t_0)}{\tau}} + I_o \quad \text{Gleichung 8}$$

wodurch man eine Zeitkonstante τ und eine Amplitude I_{amp} erhält; I_o ist der Steady-State-Strom. In Abbildung 10 ist am Beispiel einer Stromaufzeichnung eine angepaßte monoexponentielle Funktion eines transienten Stromverlaufes dargestellt.



III. Materialien

III.A. Lösungen

III.A.1. Lösungen für die Zellbehandlung

III.A.1.a) Kulturmedium

Das Kulturmedium, welches hier gemäß dem Produktnamen einer Komponente als „Alpha-Medium“ bezeichnet werden soll, besteht aus folgenden sterilen Komponenten:

90%	Minimum Essential Medium (MEM) alpha Medium (1X), flüssig, mit Ribonucleotiden und Desoxyribonucleodiden als auch Glutamax I TM (Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe)
10%	Serum neugeborener Kälber (hitzeinaktiviert durch eine 30-minütige Wasserbadbehandlung bei 56°C) (Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe)
50µg/ml	Gentamicin (Gibco Invitrogen)

Nach Herstellung des Alpha-Mediums unter sterilen Bedingungen wurde es nach einer einmonatigen Lagerung bei 4°C nicht mehr verwendet. Folgende Tabelle umfaßt die Bestandteile, welche sich laut den Angaben des Herstellers in der genannten Komponente „MEM alpha (1X), flüssig“ befinden:

Bestandteile	Molarität (mM)	Andere Komponenten:	
<i>Anorganische Salze:</i>		D-Glucose	5.55
		Liponsäure	0.000971
		Phenolrot	1.00
Calciumchlorid (CaCl ₂ 2H ₂ O)	1.80	Natriumpyruvat	1.00
Kaliumchlorid (KCl)	5.30	<i>Aminosäuren:</i>	
Magnesiumsulfat-7H ₂ O (MgSO ₄ -7H ₂ O)	0.81		
Natriumchlorid (NaCl)	117.24		
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	26.20		
Natriumphosphat-2H ₂ O (NaH ₂ PO ₄ -2H ₂ O)	1.01	L-Alanin	0.281
		L-Arginine	0.600
		L-Asparagin-H ₂ O	0.330

L-Asparaginsäure	0.230	Biotin	0.0004
L-Cystin	0.100	D-Ca Pantothenat	0.002
L-Cystein-HCl	0.826	Cholinchlorid	0.0071
L-Glutaminsäure	0.510	Folsäure	0.0022
L-Glutamin	2.00	i-Inositol	0.0111
L-Alanyl-L-Glutamin	2.00	Niacinamid	0.0081
Glycin	0.667	Pyridoxal HCl	0.0049
L-Histidin	0.200	Riboflavin	0.0002
L-Isoleucin	0.400	Thiamin HCl	0.0029
L-Leucin	0.400	Vitamin B12	0.001
L-Lysin	0.397	<i>Ribonucleoside:</i>	
L-Methionin	0.101	Adenosin	0.0375
L-Phenylalanin	0.194	Cytidin	0.0412
L-Prolin	0.348	Guanosin	0.0353
L-Serin	0.238	Uridin	0.041
L-Threonin	0.403	<i>Deoxyribonucleoside:</i>	
L-Tryptophan	0.049	2' Deoxyadenosin	0.0398
L-Tyrosin	0.199	2' Deoxycytidin HCl	0.0399
L-Valin	0.393	2' Deoxyguanosin	0.0375
<i>Vitamine:</i>		Thymidin	0.0413
L-Ascorbinsäure	0.284		

III.A.1.b) Calciumfreie Pufferlösung PBS

Die für die Zellkultur angewandte calciumfreie Pufferlösung PBS (Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) ist eine phosphatgepufferte Salzlösung und dient dazu, das verbrauchte Alpha-Medium der in Kulturflaschen wachsenden Zellen zu ersetzen. Hierdurch wird altes Medium aus der Kulturflasche ausgewaschen und die Zellen beginnen sich auf Grund der Calciumfreiheit des Puffers bereits abzulösen.

III.A.1.c) Versene-Lösung

Die Versene-Lösung (Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) entspricht der PBS-Lösung, ist jedoch mit 0,53 mM EDTA versetzt, welches in der Lage ist, Calcium komplex zu binden. Die Lösung dient zur schonenden und vollständigen Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturschale, auf welchem sie kultiviert werden.

III.A.1.d) DMSO-Lösung

DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verhindert als 10%-ige Zugabe zum Alpha-Medium die Bildung von Eiskristallen, wenn die Zellen zur Aufbewahrung eingefroren werden. Denn Eiskristalle würden die Zellen zerstören.

III.A.2. Rezepturen der bei den Experimenten verwandte Lösungen

III.A.2.a) Wasseraufbereitung

Das für den Ansatz von Lösungen verwendete Reinstwasser erfuhr folgende Aufbereitung: Leitungswasser wurde zunächst mit Hilfe handelsüblicher Ionenaustauscherharze entionisiert. Im weiteren erzeugte eine Filteranlage („Milli-Q Biocel A10“ Millipore GmbH, Schwalbach) aus dem entionisierten Wasser das verwendete Reinstwasser, welches schließlich über einen elektrischen Widerstand von 18,2 MΩ sowie einen TOC-Wert von weniger als 20 ppb der gesamten organischen Bestandteile verfügte.

III.A.2.b) Rezepturen der Badlösung sowie der Lösungen der extrazellulären Natriumreihe

In der unten aufgeführten Tabelle sind die Rezepturen der Badlösung, welche während der Experimente die Meßkammer durchfließt, sowie die Lösungen, welche ebenfalls während der Experimente aus dem Lösungswechsler fließen, aufgelistet. Die aus dem Lösungswechsler fließenden Lösungen bilden eine Natriumreihe und wurden sowohl mit als auch ohne Zusatz von 4-Amino-Buttersäure (GABA) als extrazelluläre Lösungen über die zu messende Zelle gegeben. Das Tetra-Methyl-Ammoniumchlorid (TMA-Cl) dient als Natriumchloridersatz. Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) stellt den pH-Puffer der Lösungen dar. Die Lösungen wurden mit Natriumhydroxid titriert, wobei das hierdurch hinzugefügte Natrium eine Konzentrationsänderung in den Lösungen von weniger als 1mM bewirkt. Die Lösungen haben eine mit Hilfe eines Osmometers („Halbmikro-Osmometer“, Knauer, Eppelheim) bestimmte Osmolarität von 285 mOsm.

	Badlösung bzw.	100 mM NaCl-Lösung	50 mM NaCl- Lösung	25 mM NaCl- Lösung
--	-------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

	150 mM NaCl-Lösung			
Natriumchlorid (NaCl)	150 mM	100 mM	50 mM	25 mM
Tetramethylammoniumchlorid (TMA-Cl)	-	50 mM	100 mM	125 mM
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Calciumchlorid (CaCl ₂)	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
4-Amino-Buttersäure (GABA)	± 400 µM	± 400 µM	± 400 µM	± 400 µM
pH-Wert, eingestellt mit Natriumhydroxid (NaOH)	7,2	7,2	7,2	7,2

III.A.2.c) Rezeptur der Pipettenlösung

Im folgenden ist die Rezeptur der Pipettenlösung, welche sich bei den Experimenten in der Patch-Pipette befindet und die intrazelluläre Lösung darstellt, angegeben. Die Lösung enthält Ethylenglykol-bis(β-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA) um vorhandenes freies Calcium komplexieren zu können. Kalium-D-Gluconat wird verwendet um die Osmolarität der Pipettenlösung der extrazellulären Lösung anzugleichen. Die pH-gepufferten Lösungen sind mit KOH titriert, wobei die hierdurch der Lösung beigebrachte Konzentrationsänderung weniger als 2 mM beträgt. Die Pipettenlösung besitzt eine mit Hilfe eines Osmometers („Halbmikro-Osmometer“, Knauer, Eppelheim) gemessene Osmolarität von 285 mOsm.

	Pipettenlösung
Kalium-D-Gluconat	150 mM
Magnesiumchlorid	2 mM

(MgCl ₂)	
Ethylenglykol-bis(β-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA)	5 mM
3-Morpholinopropansulfonsäure MOPS	5 mM
pH-Wert, eingestellt mit Kaliumhydroxid (KOH)	7,2

III.B. Chemikalien

4-Amino-Buttersäure (Fluka Chemie GmbH, Buchs)

Calciumchlorid-Dihydrat (E.Merck, Darmstadt)

Ethylenglykol-bis(β-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Kaliumchlorid (Fluka Chemie GmbH, Buchs)

Kalium-D-Gluconat (Fluka Chemie GmbH, Buchs)

Kaliumhydroxid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Magnesiumchlorid-Hexahydrat (Fluka Chemie GmbH, Buchs)

3-Morpholinopropansulfonsäure (Fluka Chemie GmbH, Buchs)

Natriumchlorid (Fluka Chemie GmbH, Buchs)

Natriumhydroxid (Fluka Chemie GmbH, Buchs)

Tetramethylammoniumchlorid (Fluka Chemie GmbH, Buchs)

III.C. Gerätschaften

III.C.1. Patch-Clamp-Meßstand

Ag/AgCl-Elektroden („EP1“ und „EP05“, World Precision Instruments, Berlin)

CCD-Kamera (CF4, Kappa opto-electronics GmbH, Gleichen)

Deckgläser für Meßkammerboden bzw. Zellkultur („Runde Deckgläser, 20mm Ø bzw. 12mm Ø, Stärke 0,13mm“, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen)

Elektrodenhalter aus Kunststoff (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht)

Filtern und Halbspiegeln (Filterset für GFP, Carl Zeiss, Jena)

Hydraulischer Mikromanipulator (Typ „MO-103“, Narashige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan)

Injektionsspritze („Omifix 10ml“, Braun Melsungen)

Lösungswechsler („RSC-200, Rapid Solution Changer“, Bio-Logic Co., Claix, Frankreich)

Membranpumpe („miniport“, KNF Neuberger GmbH, Freiburg)

Mikromanipulator („M3301“, Bachofer, Reutlingen)

Mikroschmiede für Glaselektroden („MF-79“, Narashige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan) (wurde umgebaut)

Mikroskop (Axiovert, Carl Zeiss, Jena)

Monitor (WV-5410, Panasonic Deutschland GmbH, Hamburg)

Osmometers („Halbmikro-Osmometer“, Knauer, Eppelheim)

Patch-Elektrodenglas („Borosilikatglaskapillaren Da=1,5 Di=0.87“ Hilgenberg, Malsfeld)

45µm -Porenfilter („Filtropur S 0,45“, Sarstedt, Nümbrecht)

Rechner (Targa 800MHz Personal Computer mit Windows Me, Actebis International Distribution GmbH, Soest)

164µm Ø Spritzennadel („MicroFil MF34G“, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA)

Startergerät (VHW 50f-2b, Carl Zeiss, Jena)

Transformator (Ernst Leitz GmbH, Wetzlar)

UV-Lampe („HBO 50 W“, Osram GmbH, München)

Verstärker („EPC9“, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht)

Wasseraufbereitung („Milli-Q Biocel A10“ Millipore GmbH, Schwalbach)

x-y-Schreiber („Recorder 2200S“, Gould, Cleveland, Ohio, USA)

Ziehgerät für Glaselektroden („PP-83“, Bachofer, Reutlingen)

III.C.2. Zellkultur

Begasungsbrutschrank („B5060 EC/CO₂“, Heraeus Instruments GmbH, Hanau)

2ml-Eppendorfgefäß (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)

50ml-Kulturflaschen („Nuncion“, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)

24-Well-Kulturschalen („Nunclon-Multischalen“, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)

-80°C-Truhe (E80-180T, Colora Meßtechnik GmbH, Lorch)

Vibrationsapparatur („Vortex-Genie 2“, Scientific Industries, New York, USA)

III.D. Software

Datenauswertung („Origin7.0“, OriginLab Corp., Northampton, USA)

Graphik („Corel Graphics Suite 11“, Corel Corporation, Ottawa, Kanada)

Literaturverwaltung („Reference Manager 10“, ISI Researchsoft, London, GB)

Textkonvertierung („Adobe Acrobat 5.0“, San Jose, USA)

Textverarbeitung („Office XP“, Microsoft, Redmond, USA)

Verstärkersteuerung („Puls“ Heka, Lambrecht)

IV. Resultate

IV.A. Steady-State-Ströme

Sucht man das Membran-Ruhepotential, welches an einer intakten biologischen Zelle auftritt, zu beschreiben, genügt folgendes Modell, um den Anforderungen an eine Erklärung des Ruhepotentials gerecht zu werden: Zwei Lösungen gleicher Osmolarität, aber unterschiedlicher Ionenkonzentration, werden durch eine für kleine Ionen permeable Membran getrennt. Vorherrschende Ionengradienten bewirken freilich eine Diffusion von Ionen über die Membran, um eben diese Gradienten auszugleichen. Jedoch weist die Membran für Ionen positiver und negativer Ladung unterschiedliche Permeabilitäten auf, was zum Aufbau eines der Diffusion entgegenwirkenden elektrischen Gradienten führt; es sammeln sich auf beiden Seiten der Membran Ladungsträger in ungleichem Maße. Dies führt zu einem elektrochemischen Gleichgewicht, in welchem der elektrische Gradient nicht mehr wächst und folglich alle über die Membran abfließenden elektrischen Ströme sich in der Summe aufheben.

Um den elektrischen Gradienten über die Membran, also das Membranpotential, zu ändern, ohne den Ionengradienten zu variieren, bedarf es weiterer Ladungsträger, welche die Kapazität der Membran wie einen elektrischen Kondensator aufladen. Neben ihren kapazitiven Eigenschaften ist die Membran aber auch durch das Merkmal der Leitfähigkeit charakterisiert, und so muß ein konstanter Strom, der sog. Steady-State-Strom fließen, damit das Potential aufrecht erhalten wird. Im Experiment stellt der Patch-Clamp-Verstärker den Strom zur Verfügung, der nötig ist, um der Zellmembran ein gewünschtes Potential aufprägen zu können.

Steady-State-Ströme sind also Ströme, die auf Grund der Membranleitfähigkeit bei einem bestimmten Potential über die Membran abfließen. Ist die Membranleitfähigkeit unabhängig vom Potential, so ergibt sich eine lineare Strom-Spannungs-Abhängigkeit. Ein vom linearen abweichendes Verhalten zeigt somit eine Potentialabhängigkeit der Leitfähigkeit an.

In Abbildung 11 sind solche Potentialabhängigkeiten von Steady-State-Strömen, die bei verschiedenen extrazellulären Natriumkonzentrationen im Rahmen der hier vorliegenden Experimente aufgenommen wurden, in einer Kurve verdeutlicht. Die Ströme sind nach dem in Kapitel II.C.2.a) beschriebenen Verfahren analysiert. Für sich genommen weist jede der Kurven deutlich eine Potentialabhängigkeit der Membranleitfähigkeit aus. Das Potential am

Nulldurchgang des Stroms wird als Umkehrpotential bezeichnet. Dieses Umkehrpotential entspricht dabei genau jenem oben erläuterten Potential, welches allein aus Ionenkonzentration und Membranpermeabilität entsteht, denn hierfür muß kein zusätzlicher Strom vom Verstärker zur Verfügung gestellt werden.

Für die im Beispiel von Abbildung 11 vorherrschenden Ionenkonzentrationen lassen sich mit Hilfe der Nernst-Gleichung:

$$V_{Nernst} = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln\left(\frac{c_o}{c_i}\right) \quad \text{Gleichung 9}$$

mit

c_o = extrazelluläre Ionenkonzentration

c_i = intrazelluläre Ionenkonzentration

RT/F = 25mV für $T = 20^\circ\text{C}$

z = Wertigkeit des Ions

Umkehrpotentiale berechnen (Umkehrpotential = Gleichgewichtspotential V_{Nernst}), wie sie in der nachstehenden Tabelle aufgeführt sind. Voraussetzung ist hierbei die Annahme, daß die Membran nur für das jeweils betrachtete Ion permeabel ist. Die Tabelle enthält außerdem die Ionenkonzentrationen, welche der Berechnung zugrunde liegen. Einige der Ionen sollten der Rezeptur nach nicht in der intra- bzw. extrazellulären Lösung vorhanden sein. Jedoch sind für die Berechnungen Verunreinigungen im Bereich von 1% der maximal im Experiment verwandten Konzentration des Ions angenommen worden.

Ion	V_{Nernst}	$c_{extrazellulär}$	$c_{intrazellulär}$
Na^+	> +120 mV	= 150 mM	< 1 mM
K^+	< -130 mV	< 1 mM	= 150 mM
Cl^-	= -95 mV	= 150 mM	= 4 mM
Mg^{2+}	= 0 mV	= 2 mM	= 2 mM
Ca^{2+}	> +40 mV	= 2 mM	< 0,1 mM

Die berechneten Umkehrpotentiale der einzelnen Ionen sind in Abbildung 11 als farbige Punkte auf der Spannungsachse markiert. Man erkennt, daß die gemessenen Umkehrpotentiale bei den verschiedenen Natriumkonzentrationen variieren, was für einen

Permeabilitätsbeitrag des Natriums spricht. Zudem liegen die gemessenen Umkehrpotentiale alle im negativen Bereich, während das berechnete Umkehrpotential für Natrium im positiven Bereich angesiedelt ist; dies kann nur auf eine zusätzliche Permeabilität der Membran für Kalium und Chlorid bzw. für eines der beiden Ionen zurückzuführen sein, da diese Ionen Umkehrpotentiale im negativen Potentialbereich aufweisen.

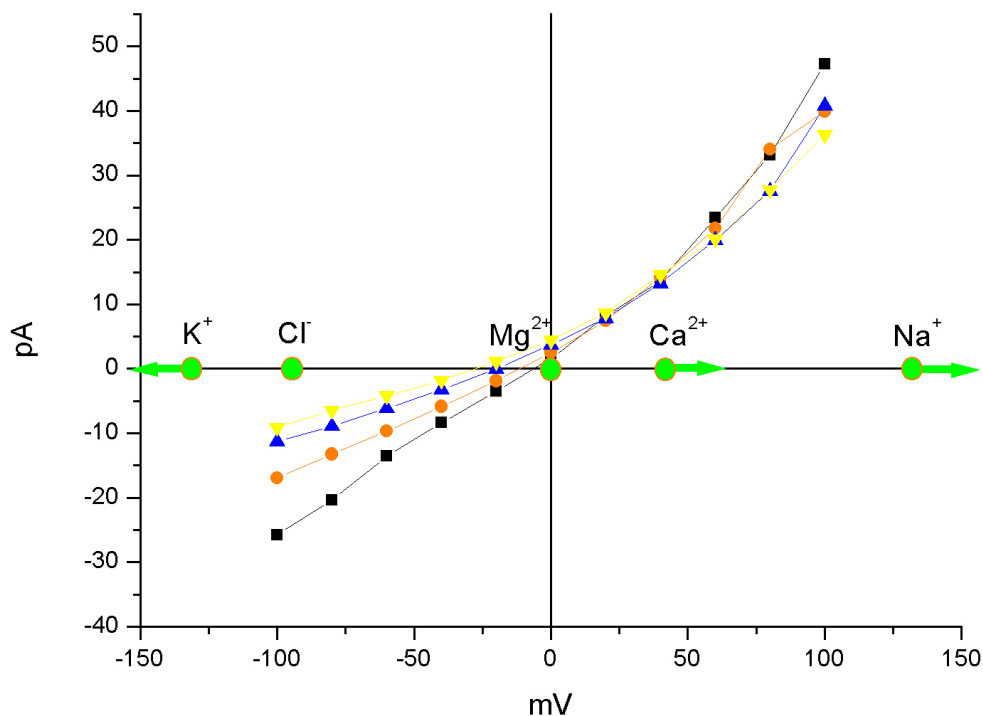


Abbildung 11: Steady-State-Ströme im Einzelexperiment an einer mit mGAT1 transfizierten CHO-Zelle, aufgenommen in Abwesenheit von GABA. Die unterschiedlichen Kurven repräsentieren Ströme die bei unterschiedlichen extrazellulären Natriumkonzentrationen aufgenommen worden sind, nämlich bei 150 mM (schwarze Vierecke), 100 mM (orange Kreise), 50 mM (blaue Dreiecke) und 25 mM (gelbe Dreiecke). Desweiteren sind Umkehrpotentiale (grüne Kreise), die nach der Nernst-Gleichung (Gleichung 9) berechnet wurden, für die verschiedenen Ionen der benutzen Lösungen in den Graphen eingetragen. Das Umkehrpotential von Natrium ist hier bei Zugrundelegung einer intrazellulären Natriumkonzentration von 1 mM berechnet worden. Da aber die intrazelluläre Natriumverunreinigung im Experiment um mindestens eine Größenordnung kleiner liegt, wird das Umkehrpotential in Richtung größerer Werte verschoben sein (grüner Pfeil). Entsprechendes gilt für Kalium mit $[K^+] \leq 1$ mM und Kalzium mit $[Ca^{2+}] \leq 0.1$ mM.

IV.A.1. GABA-induzierte Steady-State-Ströme des mGAT1

Durch Differenzbildung (ausführlich im Kapitel II.C.2.a) erläutert) aus Steady-State-Strömen in An- und Abwesenheit von GABA, die in Experimenten mit mGAT1 transfizierten CHO-Zellen gemessen wurden, erhält man GABA-induzierte Ströme, welche aus einer allein durch

GABA verursachten Membranleitfähigkeit entstehen. Als Verursacher dieser GABA-induzierten Ströme ist der durch die Transfektion in der Membran exprimierte GABA-Transporter zu sehen (ebenfalls im genannten Kapitel erläutert).

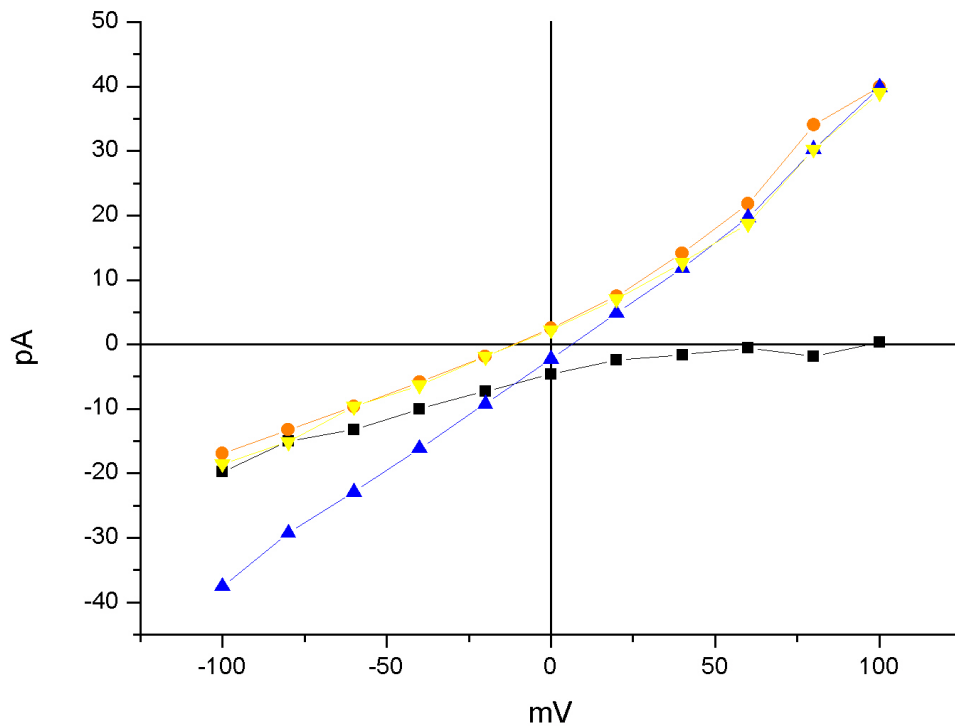


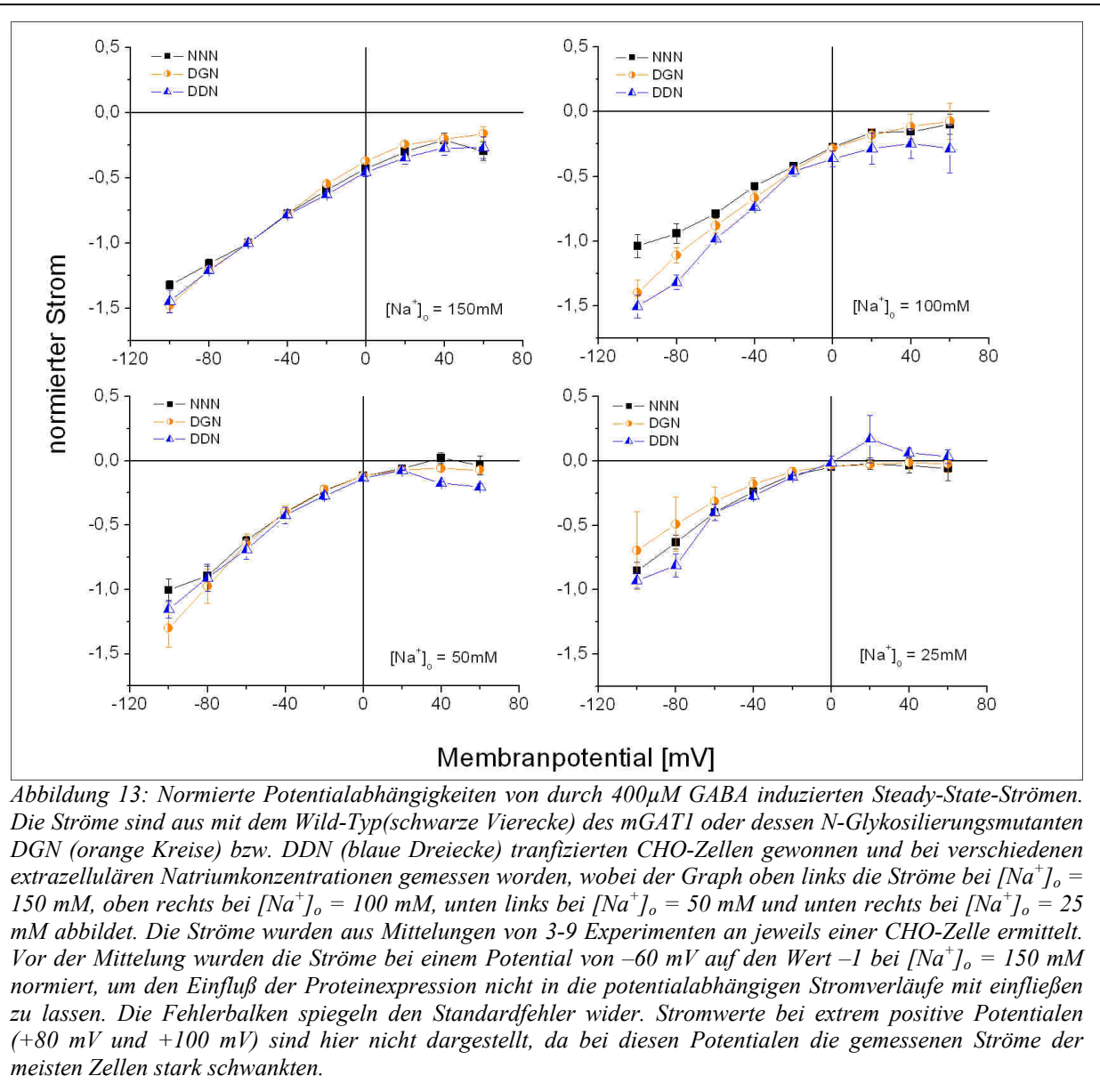
Abbildung 12: Steady-State-Ströme in Abhängigkeit vom Membranpotential eines Einzelexperiments von mit dem Wild-Typ des mGAT1 transfizierten Zellen bei $[Na^+]_o = 100$ mM. Um den GABA-induzierten Steady-State-Strom (schwarze Vierecke) bei einer bestimmten extrazellulären Natrium-Konzentration zu ermitteln, werden Messungen zunächst in Abwesenheit von GABA (orange Kreise) durchgeführt, dann in Anwesenheit von $400\mu M$ GABA (blaue Dreiecke) und schließlich, nach Wegspülen des GABA von der Zelle, wieder in Abwesenheit von GABA (gelbe Dreiecke). Man erkennt, daß die beiden Kurven, die aus den Strömen in Abwesenheit von GABA stammen, sich fast decken. Dies ist ein deutlicher Hinweis dafür, daß GABA sich leicht durch einen Lösungswechsel von der Zelle wegspülen läßt. Der ermittelte GABA-induzierte Steady-State-Strom, der sich aus der Differenz von den in An- und in Abwesenheit von GABA gemessenen Strömen ergibt, wie es in Kapitel II.C.2.a) erläutert ist, vergrößert sich seinem Betrage nach bei niedriger werdenden negativen Potentialen und verschwindet bei größer werdenden positiven Potentialen. Die Steady-State-Ströme der verschiedenen Experimente variieren jedoch im positiven Potentialbereich stark, und zwar auf Grund von Instabilitäten der Zelle bei extrem positiven Potentialen.

In Abbildung 12 sind zur Veranschaulichung zum einen die Potentialabhängigkeit der Steady-State-Ströme vor der Differenzbildung in An- und Abwesenheit von GABA dargestellt sowie zum anderen die Potentialabhängigkeit der aus der Differenzbildung resultierenden GABA-induzierten Steady-State-Ströme. Auffällig ist hierbei, daß der GABA-induzierte Steady-State-Strom lediglich aus einem Einwärtsstrom besteht, der vom Einstrom positiver Ladung (bzw. Ausstrom negativer Ladung) herrührt; ein Auswärtsstrom ist nicht detektierbar. Der

GABA-induzierte Steady-State-Strom steigt seinem Betrage nach bei kleiner werdenden negativen Potentialen an. Bei größer werdenden positiven Potentialen hingegen strebt er gegen Null. Es darf jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß gerade bei extrem positiven Potentialen die gemessenen Ströme recht instabil werden, so daß die gegen Null strebende Strom-Spannungscharakteristik nur bei ausgesprochen stabilen Zellen festgestellt werden konnte. Die in den Experimenten gemessene und in Abbildung 12 dargestellte Potentialabhängigkeit der GABA-induzierten Steady-State-Ströme entspricht unter den gegebenen Umständen durchaus der in der Literatur beschriebenen [Lu und Hilgemann 1999b].

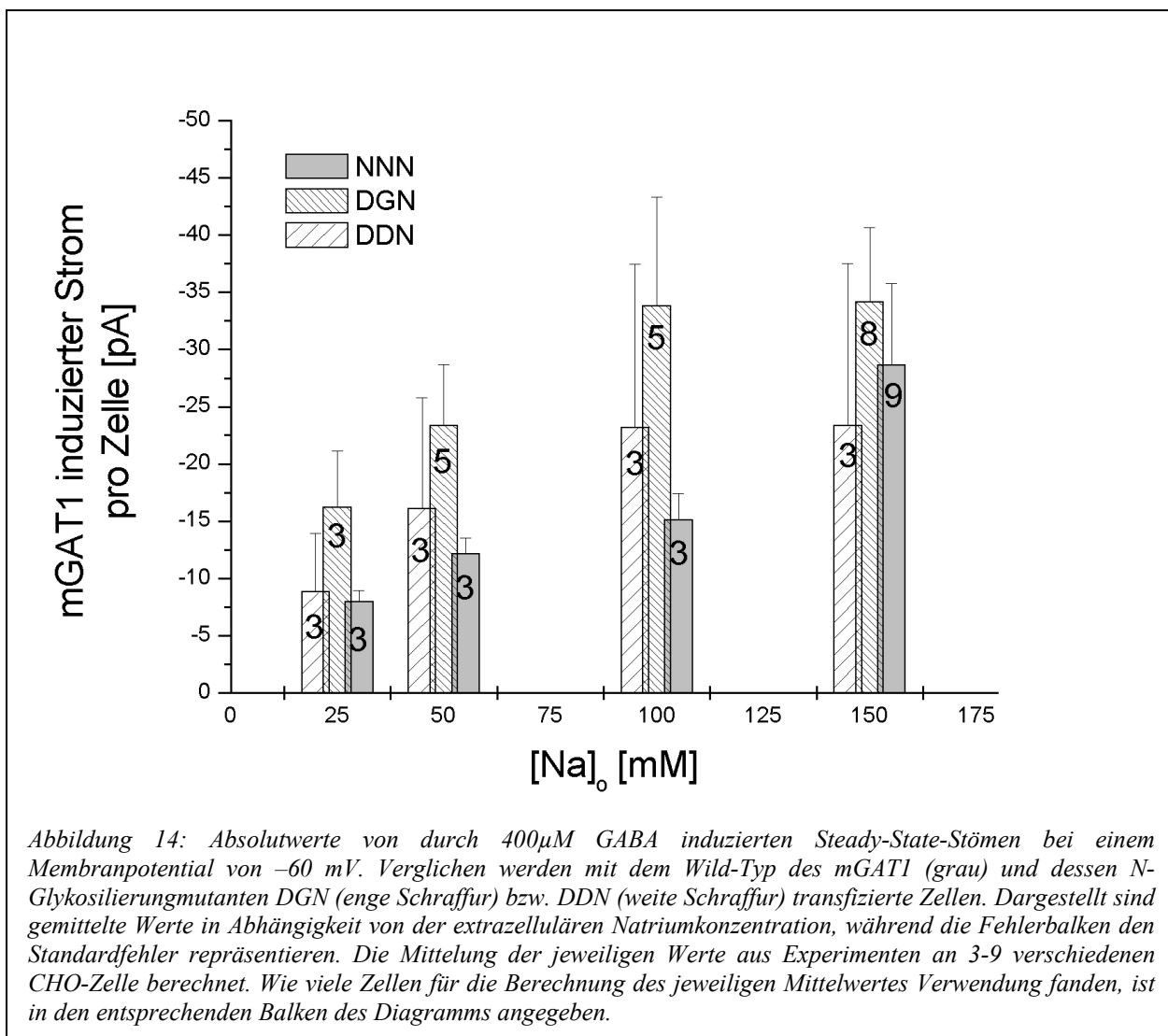
IV.A.2. GABA-induzierte Steady-State-Ströme des Wild-Typ mGAT1 sowie DGN und DDN im Vergleich

Auf eine Änderungen in der Transportcharakteristik des einzelnen Transporters läßt sich schließen, falls eine Änderung in der Potentialabhängigkeit der GABA-induzierten Steady-State-Ströme auszumachen ist. Eine Änderung der Transporterdichte auf der Membran und somit im Expressionsverhalten der Zelle drückt sich in einer Änderung der absoluten Stromwerte der GABA-induzierten Steady-State-Ströme aus, ohne jedoch einen Einfluß auf die Potentialabhängigkeit dieser Ströme zu haben.



Die in der Abbildung 13 dargestellten Potentialabhängigkeiten der GABA-induzierten Steady-State-Ströme sind jeweils für den Wild-Typ des mGAT1 und dessen Mutanten aus 3 bis 9 an unterschiedlichen Zellen durchgeführten Einzelexperimenten ermittelt. Da die jeweiligen Zellen eine unterschiedliche hohe Expressionsrate aufweisen, sind sie bei einem Membranpotential von -60 mV auf den Wert -1 normiert, eben damit ihre um den Einfluß der Expressionsrate bereinigte Potentialabhängigkeit dargestellt werden kann. Nach der Normierung erfolgt eine Mittelung über alle Experimente, wobei als Fehler der Standardfehler angegeben ist. Die Teilabbildungen in Abbildung 13 beziehen sich auf jeweils eine bestimmte extrazelluläre Natriumkonzentration. Man erkennt, daß die Kurvenverläufe für den Wild-Typ und die N-Glykosilierungsmutanten sich nicht wesentlich unterscheiden, die Potentialabhängigkeiten der GABA-induzierten Steady-State-Ströme folglich als gleichartig

zu betrachten sind, und zwar unabhängig von der im Bereich von 25 bis 150 mM liegenden extrazellulären Natriumkonzentration.



Eine Untersuchung bezüglich des unterschiedlichen Expressionsverhaltens der CHO-Zellen bei dem Wild-Typ des mGAT1 sowie dessen N-Glykosilierungsmutanten DGN gestaltet sich schwierig, will man als Meßmethode das Patch-Clamp-Verfahren einsetzen, wie in dieser Arbeit geschehen. Denn die meßbaren GABA-induzierten Stromsignale sind unter Patch-Clamp-Bedingungen äußerst klein und ergeben mitsamt dem Hintergrundrauschen häufig ein ungünstiges Signal/Rauschverhältnis etwa 4:1. So werden für die Messungen nur solche Zellen herangezogen, welche eine extrem starke Fluoreszenz (das Auswahlkriterium) aufweisen, um möglichst große GABA-induzierte Stromsignale zu erhalten. Eine Untersuchung des Expressionsverhaltens fordert jedoch eine statistisch zufällige Auswahl von Zellen; eine derartige Zufälligkeit ist aber durch das Auswahlkriterium einer starken

Fluoreszenz nicht gegeben. Deshalb zeigen die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchung eine entsprechend hohe Meßwertvarianz. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Es wird eine Tendenz sichtbar, welche dem Betrage nach einen vergrößerten Einwärtsstrom für DGN gegenüber dem Wild-Typ andeutet. Dies steht indes im Widerspruch zu Experimenten, wie sie an Oozyten gemacht wurden [Liu *et al.* 1998] und hat wahrscheinlich seine Ursache in der willkürlichen Auswahl der Zellen.

IV.B. Durch Potentialänderungen induzierte transiente Ströme des mGAT1 in Abwesenheit von GABA

Bei Abwesenheit von GABA in der extrazellulären Lösung durchläuft der GABA-Transporter nicht mehr zur Gänze den physiologischen Transportzyklus, in welchem GABA, Natrium und Chlorid über die Zellmembran in die Zelle transportiert werden (vgl. Abbildung 2). Unter diesen Bedingungen treten transiente Ströme auf, wie sie in Kapitel II.C.2.b) bereits Erwähnung fanden. Sie werden durch Potentialsprünge provoziert und treten nur bei mit mGAT1 transfizierten Zellen auf, und auch dann nur in Abwesenheit von GABA. Die Ursache der transienten Ströme ist somit in einer durch die mGAT1-Proteine verursachten Ladungsverschiebung zu suchen. Es muß also gefordert werden, daß das Reaktionsschema des oben genannten Zyklus als Teilreaktion mindestens einen elektrogenen Schritt beinhaltet, bei welchem Ladungen entlang des elektrischen Feldes verschoben werden. Obige Schlußfolgerungen setzten allerdings voraus, daß GABA lediglich im Rahmen des Transportzyklus mit dem mGAT1-Transporter wechselwirkt, jedoch keine Ströme inhibieren oder induzieren, welche nicht durch den Transportzyklus zu beschreiben sind. Es ist noch anzumerken, daß die verschobenen Ladungen nicht zwingend die an das Protein gebundenen Liganden Natrium bzw. Chlorid sein müssen. Es ist auch die Möglichkeit einer Interaktion der Liganden mit dem Protein denkbar, welche zu einer Translokation geladener Gruppen im Protein führen könnte.

Fordert man mindestens einen elektrogenen Reaktionsschritt im Teilzyklus, muß das elektrische Potential die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionsschritte (wie unten in Gleichung 20 gezeigt) und somit die Gleichgewichtskonstante der Reaktion beeinflussen. Ein Reaktionsgleichgewicht stellt sich demnach nur bei einem zeitlich konstanten elektrischen Feld ein.

Betrachten wir ein einzelnes Transportprotein beim Durchlaufen durch die Reaktionskette des Teilzyklus, so bezeichnen wir den jeweiligen Aufenthalt des Proteins zwischen zwei

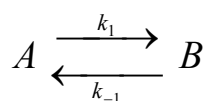
Reaktionsschritten als „Zustand des Transporters“ und die Schritte selbst als „Zustandsänderungen des Transporters“ (es handelt sich bei dem Zustand eines einzelnen Moleküls nicht um einen Zustand des Gesamtsystems, er hat somit nichts mit dem Gleichgewichtszustand gemein). Auf die Gesamtheit aller Transportproteine der Zelle bezogen folgt aus dem oben Erläuterten, daß die Besetzung mindestens zweier Zustände mit Transportproteinen durch das vorherrschende elektrische Feld bestimmt wird, da die entsprechende Zustandsänderung dem elektrogenen Reaktionsschritt zuzuordnen ist.

Wird von einem Potential auf ein anderes gesprungen, so stellt sich in der Reaktionskette ein neuer Gleichgewichtszustand des Systems ein, bei dem sich die Verteilung der Transporter auf die Zustände geändert hat. Ein bestimmter Anteil an Transportern muß also während des Sprunges mindestens eine Zustandsänderung durchlaufen haben und ruft auf Grund der hierdurch verursachten Ladungsverschiebung den transienten Strom hervor. Die Zeitcharakteristik des Stromabfalls beschreibt die Rückkehr des System in einen Gleichgewichtszustand.

Bei extrem negativen und extrem positiven Potentialen erreicht man eine Situation, in welcher sämtliche Transportproteine die mit den elektrogenen Reaktionsschritten verknüpften Zustandsänderungen in gleicher Reaktionsrichtung überwunden haben. Hierbei führt ein Sprung auf noch extremere Potentiale gleichen Vorzeichens nicht mehr zu transienten Strömen.

Um das zeitabhängige Verhalten des transienten Stroms zu beschreiben, bedarf es nun der Kenntnis hinsichtlich der Besetzungswahrscheinlichkeiten der verschiedenen Zustände des Transporters. Im folgenden soll als einfachstes Modell ein solches betrachtet werden, das nur zwei Zustände berücksichtigt, wobei ein bestimmter Prozentsatz der Transportmoleküle nach einem Spannungssprung eine Zustandsänderung von einem Ausgangszustand zu einem Endzustand durchläuft.

Als zugrundeliegendes enzymkinetischen Reaktionsmodell, welches dem Modell mit zwei Zuständen genügt, soll zunächst eine in beide Richtungen monomolekulare Reaktion herangezogen werden. Sie soll den einzigen elektrogenen Schritt im Teilzyklus darstellen:



Gleichung 10

Die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion soll hier mit k_1 und die der Rückreaktion mit k_{-1} benannt sein. Anhand dieses Reaktionsmodells läßt sich, wie nachfolgend gezeigt ist, die

Zeitabhängigkeit der Besetzungswahrscheinlichkeit $p_I(t)$ erhalten. Betrachtet man nämlich die zeitliche Ableitung der Konzentration c_a von A so erhält man:

$$\frac{dc_a}{dt} = -k_1 \cdot c_a(t) + k_{-1} \cdot c_b(t) \quad \text{Gleichung 11}$$

mit c_b für die Konzentration von B.

Da sich die Gesamtkonzentration c_{ges} aller Transporter nicht ändert, können die Konzentrationen c_a und c_b durch die jeweiligen Besetzungswahrscheinlichkeiten der Zustände (p_I und p_2) ausgedrückt werden:

$$c_a(t) = c_{ges} \cdot p_1(t) \text{ bzw. } c_b(t) = c_{ges} \cdot p_2(t) \text{ mit } p_1(t) + p_2(t) = 1 \quad \text{Gleichung 12}$$

Hieraus ergibt sich mit Gleichung 11 für die Besetzungswahrscheinlichkeit $p_I(t)$:

$$\frac{dp_1(t)}{dt} = -k_1 \cdot p_1(t) + k_{-1} \cdot (1 - p_1(t)) \quad \text{Gleichung 13}$$

Diese Differentialgleichung erster Ordnung kann mit folgendem exponentiellen Ansatz gelöst werden:

$$p_1(t) = p_1(\infty) - (p_1(\infty) - p_1(0)) \cdot e^{-t/\tau} \quad \text{Gleichung 14}$$

$$\text{mit } \tau = \frac{1}{k_1 + k_{-1}} \quad \text{Gleichung 15}$$

$$\text{und } p(\infty) = \frac{k_{-1}}{k_1 + k_{-1}} \quad \text{Gleichung 16}$$

Die obige Gleichung beschreibt, wie sich die Besetzungswahrscheinlichkeit des Anfangszustandes mit der Zeit ändert. Folgende Überlegungen führen uns von dieser Gleichung zum Zeitverhalten des transienten Stroms: Berücksichtigt man, daß jedes mGAT1-Transportmolekül eine spezifische Leitfähigkeit γ besitzt und daß es zum Zeitpunkt t eine

Anzahl von $n(t)$ Transportern gibt, welche potentiell an einer Zustandsänderung vom Anfangs- in den Endzustand teilnehmen können, dann ergibt sich hieraus eine Gesamtleitfähigkeit $\Gamma = n(t) \cdot \gamma$. Nach einem Spannungssprung ΔV zur Zeit $t=0$ führt dies zum Zeitpunkt t zu folgendem transienten Strom:

$$I(t) = \Gamma \cdot \Delta V = n(t) \cdot \gamma \cdot \Delta V \quad \text{Gleichung 17}$$

Die Anzahl $n(t)$ berechnet sich aus der Gesamtzahl aller Transporter der Zellmembran und dem zeitlich veränderlichen Teil der Besetzungswahrscheinlichkeit des Anfangszustandes aus Gleichung 14 ($p_1(\infty)$ beschreibt den zeitunabhängigen Anteil an Transportern im Anfangszustand, welcher nicht an Ladungsverschiebungen beteiligt ist):

$$I(t) = \gamma \cdot \Delta V \cdot (p_1(0) - p_1(\infty)) \cdot e^{-t/\tau} = I(\infty) \cdot e^{-t/\tau} \quad \text{Gleichung 18}$$

Jede der Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_{-1} ist neben der Temperatur T auch von der Aktivierungsenergie E_a abhängig:

$$k = A \cdot e^{-E_a/RT} \quad \text{Gleichung 19}$$

wobei A eine Konstante ist.

Da die Aktivierungsenergie bei einem elektrogenen Reaktionsschritt natürlich auch durch das elektrische Potential V_m vorgegeben wird, sind nach Gleichung 19 die Geschwindigkeitskonstanten und nach Gleichung 15 die Zeitkonstanten vom Potential V_m abhängig:

$$E_a = E_a(V_m) \text{ und } k = k(V_m) \text{ und somit } \tau = \tau(V_m) \quad \text{Gleichung 20}$$

Letzteres bedeutet nichts anderes, als daß die Zeitkonstante, mit der der transiente Strom relaxiert, nicht von dem Potential abhängt, welches vor dem induzierenden Spannungssprung vorherrschte, sondern nur von dem Potential, auf welches gesprungen wird. Transiente Ströme, die während des Spannungsprotokolls aufgezeichnet wurden, sollten deshalb bei den Rücksprüngen auf das Haltepotential von -30 mV immer die gleiche Zeitkonstante aufweisen.

Die Strom-Zeit-Verläufe, der durch die Rücksprünge auf das Haltepotential induzierten transienten Ströme sind zur Auswertung mit monoexponentiellen Funktionen angepaßt. In allen Fällen genügt eine derartige Funktion völlig, wie es Abbildung 10 exemplarisch vorführt.

Das Strom-Zeitverhalten der aus den Messungen sich ergebenden transienten Ströme entspricht nunmehr der Voraussage des zunächst angenommenen einfachen Modells einer einzigen elektrogenen Zustandsänderung des Transporters. Weitere Zwischenzustände und somit eine größere Zahl elektrogener Reaktionsschritte würden sich durch ein heteroexponentielles Verhalten des transienten Stromverlaufes äußern, wobei die verschiedenen Zeitkonstanten der Exponentialfunktionen aus den Geschwindigkeitskonstanten der unterschiedlichen Reaktionsschritte herrühren. Da ein solches heteroexponentielles Verhalten aus den gemessenen Stromverläufen nicht ersichtlich ist, wird ein Modell mit mehreren elektrogenen Reaktionsschritten nicht berücksichtigt.

Unser Zwei-Zustände-Modell der Transporter berücksichtigt bisher für die elektrogene Zustandsänderung eine für beide Richtungen monomolekulare Reaktion. Derartige Reaktionen schließen jedoch nicht einen Bindungsschritt eines Liganden an das Enzym ein. Eine solche Reaktion umfaßt als Hinreaktion einen bimolekularen Schritt, bei dem sich aus Ligand L und Enzym E ein Liganden-Enzymkomplex bildet; die Rückreaktion ist wieder monomolekular:



Für mGAT1 als exprimiertes Protein in der Zellmembran ist die Zahl der Transporter gemessen an der Zahl der vorhandenen Liganden Natrium und Chlorid im extrazellulären Medium sehr klein, und somit gilt:

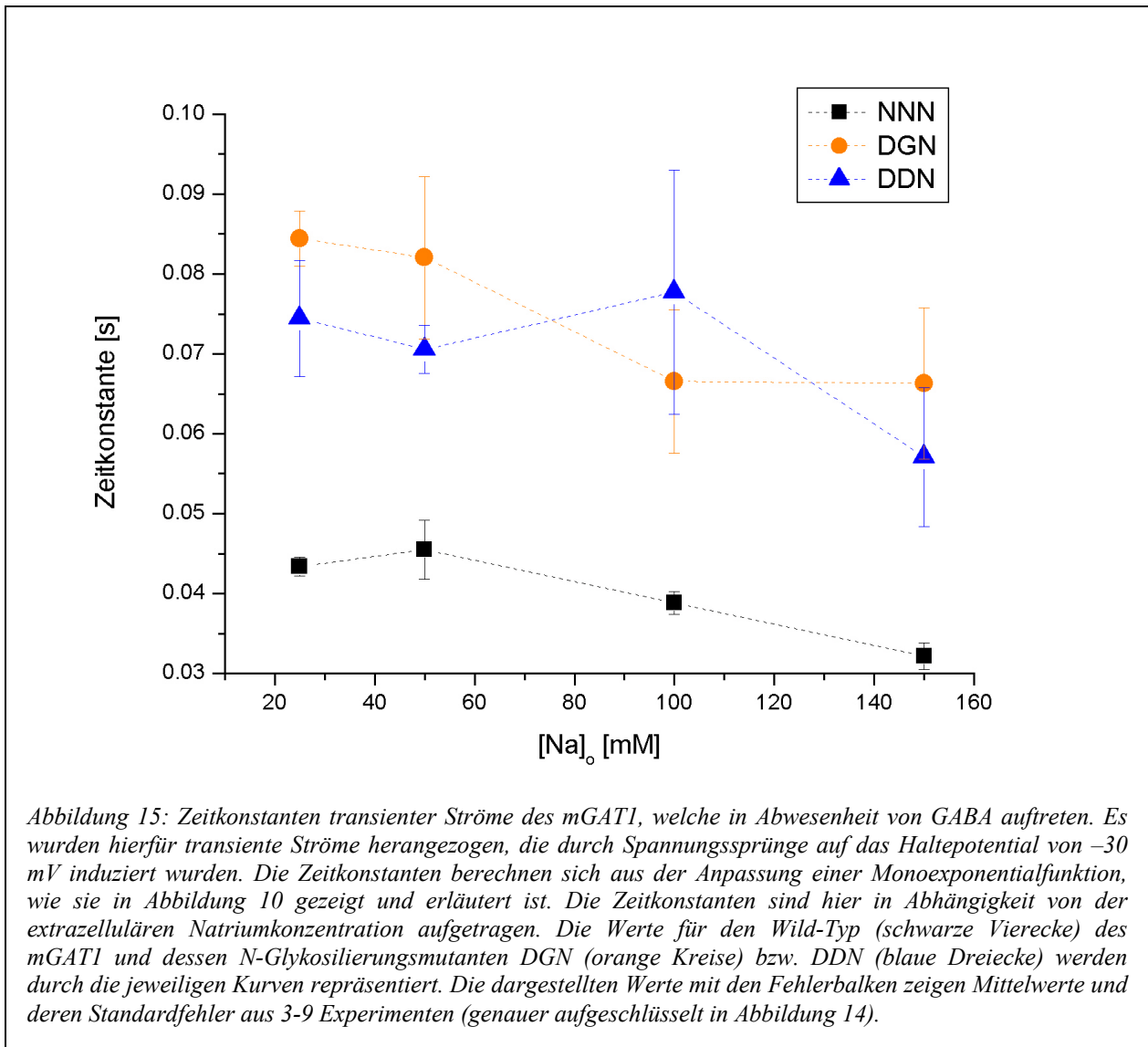
$$E \ll L \quad \text{Gleichung 22}$$

In diesem Fall hängt die Gleichgewichtskonstante der Reaktion nur von der Konzentration des Liganden-Enzymkomplexes und der Enzymkonzentration ab, nicht jedoch von der Ligandenkonzentration. Das heißt, daß man auch im diesem Fall einer Bindung von dem

Liganden an das Enzym von einer in beide Richtungen monomolekularen Reaktion (entsprechend Gleichung 10) ausgehen kann.

IV.B.1. Vergleich von Zeitkonstanten transienter Ströme des mGAT1 sowie DGN und DDN

Wurden im vorherigen Kapitel die Zeitverläufe transienter Ströme anhand eines Zwei-Zustände-Modells theoretisch behandelt, sollen in diesem Kapitel die aus den Meßdaten gewonnenen Ergebnisse dargelegt werden. In Abbildung 15 sind die aus der monoexponentiellen Funktionsanpassung an die transienten Ströme erhaltenen Zeitkonstanten für den Wild-Typ des mGAT1 sowie dessen N-Glykosilierungsmutanten dargestellt. Die Zeitkonstanten wurden aus Potentialsprüngen auf das Haltepotential von -30 mV ermittelt. Wie bereits erwähnt (Gleichung 20), ist die Zeitkonstante nur von dem Potential abhängig, auf das gesprungen wird, und nicht vom Ausgangspotential. Es war deshalb nicht notwendig, Ströme zur Auswertung der entsprechenden Zeitkonstanten heranzuziehen, welche von einem gleichen Potentialsprung verursacht wurden. Das Auswahlkriterium war hierbei vielmehr eine größtmögliche Amplitude des transienten Stroms bei maximaler Stabilität desselbigen, um eine gute monoexponentielle Funktionsanpassung durchführen zu können. Die Ergebnisse wurde aus Mittelungen derselben Experimente erhalten, wie sie schon für Abbildung 14 in Anschlag gebracht wurden. Gerade hinsichtlich der Zeitkonstanten muß erwähnt werden, daß die Filtereinstellung des Tiefpaßfilters des Verstärkers (siehe auch II.B.2) während der gesamten Experimente auf eine Frequenz von 1kHz eingestellt war, wodurch die gemessenen transienten Ströme mit ihren im Bereich von 300 - 900 ms liegenden Zeitkonstanten nicht beeinflußt wurden. Die Zeitkonstanten der N-Glykosilierungsmutanten zeigen mit Blick auf alle verwendeten extrazellulären Natriumkonzentrationen gegenüber den Zeitkonstanten des Wild-Typs um ca. 100% höhere Werte. Das beim Wild-Typ auftretende konzentrationsabhängige Verhalten, welches eine Abnahme der Zeitkonstante bei höheren Natriumkonzentrationen zeigt, ist bei den N-Glykosilierungsmutanten gleichartig ausgebildet. Eine Veränderung der Zeitkonstante kann nach Gleichung 15 eine Veränderung der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion bedeuten.



IV.C. Ladungsverschiebungen am Enzym des mGAT1 in Abwesenheit von GABA

Die bei Abwesenheit von GABA auftretenden Ladungsverschiebungen nach einem Spannungssprung gemäß dem Spannungsprotokoll (Abbildung 8) erzeugen einen transienten Strom (IV.B). Die Ladungsmenge, die während eines solchen Spannungssprunges verschoben wird, wurde durch eine Zeitintegration eben dieses transienten Stroms ermittelt. Die Basislinie der Integralbildung führt hierbei entlang des Wertes, bei welchem der transiente Strom relaxiert. Zur Kalkulation der Ladungsverschiebungen Q wurden jedoch nicht die Ströme selbst, sondern die angepassten monoexponentiellen Funktionen integriert, wobei die Integrationsfläche dem Produkt aus der Amplitude A und der Zeitkonstanten τ der Exponentialfunktion entspricht:

$$Q(V_m) = A(V_m) \cdot \tau(V_m)$$

Gleichung 23

Zur Auswertung wurden nur die Ströme herangezogen, welche durch Rücksprünge von den im Spannungsprotokoll (Abbildung 8) vorgegebenen Potentialen verursacht wurden. Damit hat es folgende Bewandnis: Zum einen zeigen die aufgezeichneten Ströme, welche durch Potentiale von mehr als +60 mV bzw. weniger als -80 mV hervorgerufen wurden, eine größere Instabilität nach Rücksprung auf das Haltepotential von -30 mV. Zum anderen wird die Amplitude des transienten Stroms für kleiner werdende Spannungssprünge ebenfalls kleiner. Dies führt zu einer ungenaueren Funktionsanpassung. Beim Rücksprung auf gleiche Potentiale kann man zur genaueren Funktionsanpassung sich die Randbedingung, wie sie in Gleichung 20 beschrieben ist, zunutze machen, daß nämlich hierbei die Zeitkonstante ebenfalls gleich bleibt. Die Zeitkonstante braucht so nur noch an Stromverläufen bestimmt zu werden, welche die beste Funktionsanpassung liefern; dies sind die Stromverläufe mit den größten Amplituden. Entsprechend Gleichung 20 kann man bei der Anpassung der anderen Stromverläufe sodann den Parameter der Zeitkonstante festhalten und gewinnt auf diese Weise auch eine genauere Anpassung für Stromverläufe mit kleineren Amplituden.

Geht man zur Erklärung der transienten Ströme von einem Zwei-Zustände-Modell (IV.B) für jedes Transportmolekül, sowie davon aus, daß die Besetzungswahrscheinlichkeit der Zustände vom vorherrschenden Potential abhängt, so kann man diese Zustände auch als mit elektrisch geladenen Teilchen bevölkerte Energieniveaus betrachten. Das elektrische Potential beeinflußt hier die Energie der Teilchen und ist damit für die Verteilung der Teilchen auf die Niveaus verantwortlich. Da die Anzahl der Teilchen begrenzt ist und keines von ihnen gleichzeitig in beiden Niveaus vorkommen kann, kann für dieses Modell die Fermi-Statistik angewandt werden. Jedes Teilchen erhält durch das angelegte elektrische Potential V_m die Energie:

$$W_{el} = z \cdot V_m \cdot F$$

Gleichung 24

Es ergibt sich nun folgende Form der Fermi-Gleichung für die potentialabhängige Ladungsverschiebung:

$$Q(V_m) = Q_{\min} + \frac{Q_{\max} - Q_{\min}}{1 + e^{\frac{(V_m - V_{\text{Mitte}}) \cdot z_q \cdot F}{R \cdot T}}}, \quad \text{Gleichung 25}$$

wobei bei einer Temperatur von 25°C der Ausdruck $R \cdot T/F$ einen Wert von 25 mV annimmt. Es wird in der obigen Gleichung anstelle der Valenz z die scheinbare Valenz z_q verwendet, um dadurch zum Ausdruck zu bringen, daß auf die bewegten Ionen nicht unbedingt das gesamte angelegte Feld wirkt. Die scheinbare Valenz z_q ist also ein Produkt aus der Valenz z und einem Feldanteil δ :

$$z_q = z \cdot \delta \quad \text{Gleichung 26}$$

Die Fermi-Energie hat nach Gleichung 25 den Ausdruck $V_{\text{Mitte}} \cdot z_q \cdot F$. V_{Mitte} soll hier als „Mittelpunktpotential der Ladungsverschiebung“ bezeichnet werden und stellt jenes Potential dar, bei welchem sich die Transporter hinsichtlich ihrer Anzahl genau zu 50% auf die beiden möglichen Niveaus verteilen.

Die maximal mögliche Ladungsverschiebung Q_{tot} ergibt sich aus der Differenz der beiden Extremwerte der Fermi-Gleichung:

$$Q_{\text{tot}} = Q_{\max} - Q_{\min} \quad \text{Gleichung 27}$$

Die potentialabhängigen Ladungsverschiebungen, welche aus den gemessenen transienten Strömen ermittelt werden konnten, wurden mit Blick auf das oben vorgeschlagene Modell mit der Fermi-Gleichung (Gleichung 25) angepaßt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

IV.C.1. Vergleich der Ladungsverschiebungen vom Wild-Typ des mGAT1, sowie DGN und DDN

Die Ladungsverschiebungen wurden aus den transienten Strömen berechnet, die von Potentialrücksprüngen auf das Haltepotential hervorgerufen wurden, wie im vorherigen Kapitel beschrieben. Diese Berechnung wurde anhand von Gleichung 23 aus der Amplitude und der Zeitkonstante einer monoexponentiellen Funktionsanpassung an die Ströme durchgeführt.

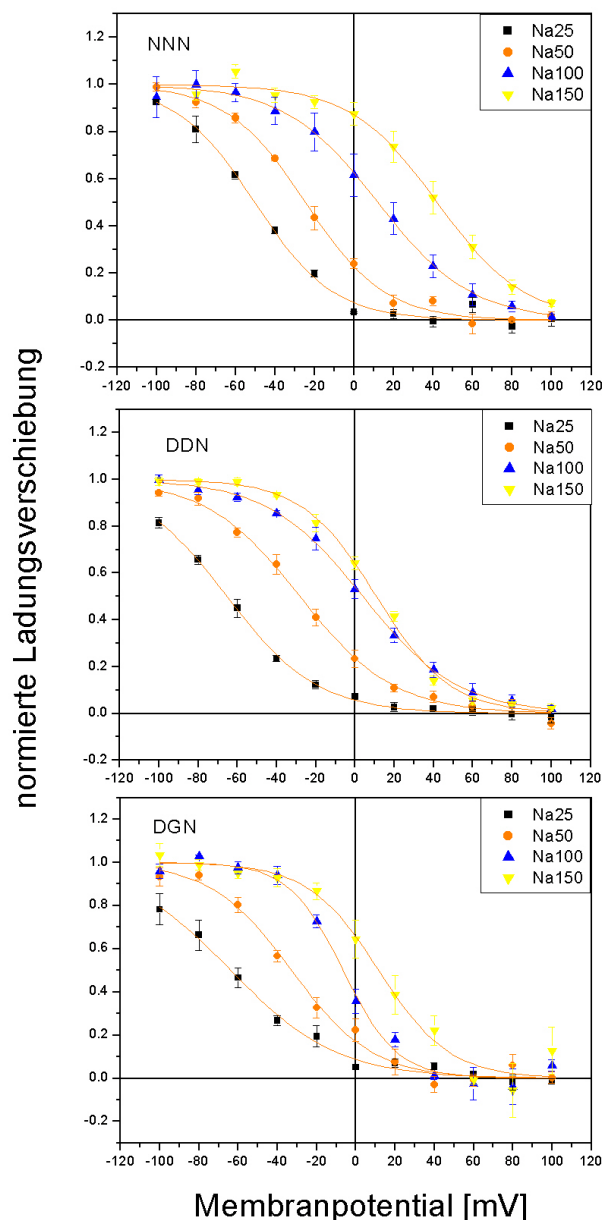


Abbildung 16: Ladungsverschiebungen des mGAT1 induziert durch Spannungssprünge vom jeweiligen, auf der x-Achse aufgetragen Membranpotential auf das Haltepotential von -30 mV. Die Ladungsverschiebungen werden aus der monoexponentiellen Funktionsanpassung der transienten Ströme, welche beim entsprechenden Spannungssprung in Abwesenheit von GABA entstehen, gewonnen. Hierbei berechnet sich der Wert für die Ladungsverschiebung aus dem Produkt von Amplitude und Zeitkonstante, die man, wie in Abbildung 10 erläutert, aus der Funktionsanpassung erhält. Dieser Wert entspricht also dem Integral der angepaßten Exponentialfunktion. Es sind in den jeweiligen Graphen der Abbildung Ladungsverschiebungen vom Wild-Typ (oben) des mGAT1 oder dessen N-Glykosilierungsmutanten DGN (Mitte) bzw. DDN (unten) dargestellt. Innerhalb der Graphen werden die Ladungsverschiebungen bei verschiedenen extrazellulären Natriumkonzentrationen miteinander verglichen, nämlich bei $[Na^+]_o = 150$ mM (gelbe Dreiecke), bei $[Na^+]_o = 100$ mM (blaue Dreiecke), bei $[Na^+]_o = 50$ mM (orange Kreise) und bei $[Na^+]_o = 25$ mM (schwarze Vierecke). Der Verlauf der Ladungsverschiebung sollte in seinem Verhalten einer Fermi-Gleichung folgen, weshalb die Verläufe mit einer solchen Gleichung angepaßt wurden. Die Ergebnisse dieser Anpassung sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Um die Ladungsverschiebungen bei den einzelnen Experimenten vergleichen zu können, wurden sie, wie im Text erläutert, normiert, so daß die Extrema der Verschiebung nach Fermi auf den Werten 0 und 1 liegen. Die gezeigten Fehler entsprechen den Standardfehlern gemittelter Verläufe aus 3-9 Experimenten (genauer aufgeschlüsselt in Abbildung 14).

Die so erhaltenen spannungsabhängigen Verläufe der Ladungsverschiebungen wurden mit der Fermi-Gleichung in der Form von Gleichung 25 angepaßt. Für jede Zelle ergeben sich wegen der unterschiedlichen Membranoberflächen und der somit unterschiedlichen Anzahl an Transportproteinen ebenfalls unterschiedliche Werte für die maximal mögliche Ladungsverschiebung Q_{tot} (Gleichung 27), da dieser Wert, wie später noch erläutert (IV.C.4), proportional mit der Anzahl der auf der Membran befindlichen mGAT1-Transportmoleküle zusammenhängt. Um eine Mittelung von Verläufen der Ladungsverschiebungen, welche an unterschiedlichen Zellen gemessen wurden, durchführen zu können, mußten die Werte der Ladungsverschiebungen einer Zelle um den jeweiligen, aus der Anpassung der Fermi-Gleichung erhaltenen Extremwert Q_{min} verschoben werden. Danach wurden sie mit dem entsprechenden Werten von Q_{tot} normiert. Damit liegt der Bereich der Fermi-Verteilung für alle Verläufe zwischen den Extremwerten 0 und 1. Die durch die Anpassung der Fermi-Gleichung gewonnenen Werte z_q und V_{Mitte} werden durch eine derartige Normierung nicht beeinflußt; es wird lediglich der Einfluß der Transporterzahl auf die Ergebnisse eliminiert. Die aus der Normierung gewonnenen Werte der Ladungsverschiebung für den Wild-Typ des mGAT1 und dessen N-Glykosilierungsmutanten sind in Abhängigkeit vom Potential in Abbildung 16 dargestellt. Die Werte zeigen Mittelungen aus mehreren Experimenten an verschiedenen Zellen sowie die Standardfehler der Mittelungen. Es sind die selben Experimente, welche auch der Abbildung 14 zugrunde liegen, in der die Anzahl an Einzelexperimenten aufgetragen ist, die zur Ermittlung des jeweiligen Mittelwertes beitrugen. Die dargestellten Verläufe des Wild-Typs des mGAT1 weisen eine deutliche Verschiebung entlang der Spannungs-Achse bei unterschiedlichen extrazellulären Natriumkonzentrationen auf. Vergleicht man diese Verläufe mit denen der N-Glykosilierungsmutanten, so erkennt man deutlich einen Unterschied in der Natriumkonzentrationsabhängigkeit der Mittelpunktspotentiale. Außerdem zeigt sich ein Unterschied in den Steigungen am Mittelpunktspotential, welche proportional zur scheinbaren Valenz z_q ist. Um diese Unterschiede genauer herausarbeiten zu können, wird in den folgenden zwei Kapiteln ein Vergleich der Werte des Mittelpunktspotentials sowie der Valenz vorgenommen.

IV.C.2. Vergleich zwischen dem Wild-Typ des mGAT1, der Mutante DDN sowie DGN über Mittelpunktspotentiale der Ladungsverschiebung aus einer Funktionsanpassung nach Fermi

Im oberen Graphen der Abbildung 17 sind die Mittelpunktspotentiale der Ladungsverschiebung V_{Mitte} nach Gleichung 25 in Abhängigkeit von der extrazellulären Natriumkonzentration aufgetragen. Die Werte sind aus Mittelungen berechneter Mittelpunktspotentiale von Einzelexperimenten gewonnen worden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes. Man erkennt, daß die an den N-Glykosilierungsmutanten DGN und DDN des mGAT1 gezeigten Verläufe tendenziell - und bei einigen Werten sogar signifikant - stärker im negativen Bereich liegen als die entsprechenden, am Wild-Typ gezeigten. In allen Fällen ist eine deutliche Natriumabhängigkeit auszumachen. Wie sich nun eine Natriumabhängigkeit des Mittelpunktspotentials in das verwandte Zwei-Zustände-Modell des Transporters einbinden läßt, dies sei im folgenden erläutert:

Wie bereits erwähnt, sind beim Vorherrschen des Mittelpunktspotentials die Transportmoleküle jeweils zur Hälfte auf die zwei Zustände der Transporter verteilt. Dies bedeutet für die Gleichgewichtskonstante $K_{Gleichgewicht}$ der Reaktion nach Gleichung 10 im Falle des Potentials V_{Mitte} :

$$K_{Gleichgewicht} = \frac{c_B}{c_A} = \frac{k_1}{k_{-1}} = 1 \quad \text{Gleichung 28}$$

Nach der Arrhenius-Gleichung (Gleichung 19) ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$\frac{A_1}{A_{-1}} \cdot e^{-\frac{(E_A^1 - E_A^{-1})}{RT}} = \frac{A_1}{A_{-1}} \cdot e^{-\frac{(\Delta H)}{RT}} = 1 \quad \text{Gleichung 29}$$

Die Enthalpie ΔH entspricht der Differenz aus den Aktivierungsenergien der Hin- und Rückreaktion. Herrscht das elektrische Potential V_{Mitte} vor, setzt sich die Enthalpie nicht nur aus einem chemischen, sondern auch aus einem elektrischen Anteil zusammen, welcher sich als x-ter Anteil der Fermi-Energie aus Gleichung 25 beschreiben läßt:

$$\Delta H = \Delta H_{\text{chemisch}} + \Delta H_{\text{elektrisch}} = \Delta H_{\text{chemisch}} + x \cdot V_{\text{Mitte}} \cdot z_q \cdot F \quad \text{Gleichung 30}$$

Löst man Gleichung 29 mit Gleichung 30 nach V_{Mitte} auf, erhält man eine Gleichung, bei der nur die Funktion y von der Natriumkonzentration c_{Na} abhängen kann (denn die scheinbare Valenz z_q ist zumindest für den Wild-Typ des mGAT1 und für die N-Glykosilierungsmutante DGN im gemessenen Natriumkonzentrationsbereich konzentrationsunabhängig, wie im nächsten Kapitel dargestellt wird):

$$V_{\text{Mitte}}(c_{\text{Na}}) = \frac{R \cdot T}{z_q \cdot F} \cdot \ln(y(c_{\text{Na}})) \quad \text{Gleichung 31}$$

Im einfachsten Falle könnte man für die Funktion y eine lineare Abhängigkeit zur Natriumkonzentration annehmen:

$$y(c_{\text{Na}}) = \frac{c_{\text{Na}}}{K_{\text{Na}}}, \quad \text{Gleichung 32}$$

wobei K_{Na} eine von der Natriumkonzentration unabhängige Konstante darstellt. Diese Annahme würde z.B. für einen Fall zutreffen, bei dem ein Natriumbindungsschritt dem hier betrachteten elektrogenen Reaktionsschritt (Gleichung 10) vorangeht.

Paßt man an die im oberen Graph der Abbildung 17 abgebildeten Werte eine logarithmische Funktion in Form von Gleichung 31 an, so erhält man Verläufe, welche mit dem Logarithmus der Natriumkonzentration aufgetragen (wie im unteren Teil der Abbildung 17 geschehen) eine lineare Abhängigkeit der Funktion y erkennen lassen. Hierdurch wird ein dem elektrogenen Reaktionsschritt vorgelagerter Natriumbindungsschritt sehr wahrscheinlich.

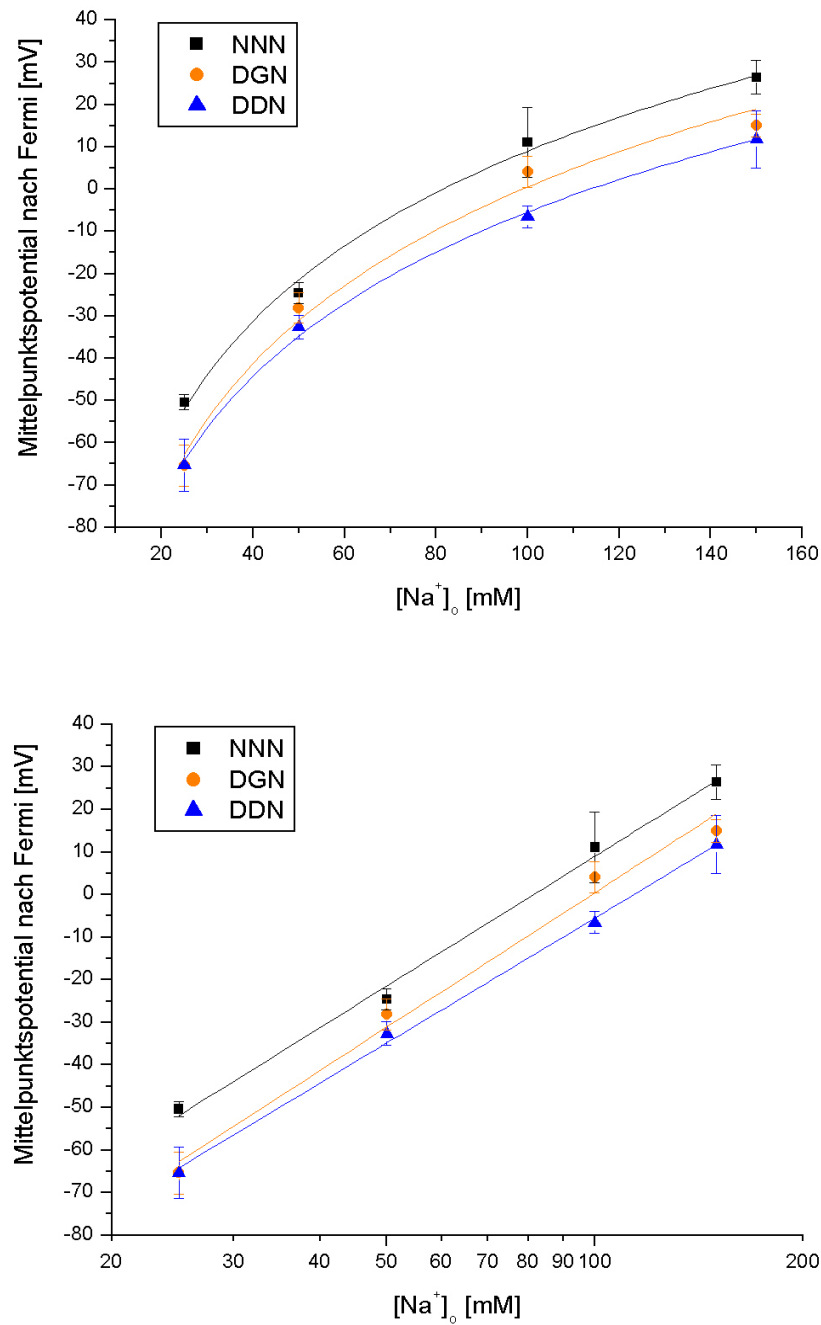


Abbildung 17: In beiden Graphen der Abbildung sind aus einer Anpassung mit der Fermi-Gleichung (Gleichung 25) berechnete Mittelpunktpotentiale V_{mitte} von Ladungsverschiebungen transienter Ströme (aus Abbildung 16) dargestellt. Beide Graphen zeigen die selben Werte bei unterschiedlicher Darstellungsweise. Im oberen Graphen sind die Mittelpunktpotentiale in Abhängigkeit von der vorherrschenden extrazellulären Natriumkonzentration gebracht, während im unteren Graphen der Logarithmus der selben Natriumkonzentrationen als Bezugsgröße gewählt wurde. Die Werte für den Wild-Typ des mGAT1 erscheinen in den Graphen als schwarze Vierecke, die der N-Glykosilierungsmutanten DGN sowie DDN als orange Kreise bzw. als blaue Dreiecke. Jeder der gezeigten Werte ist ein Mittelwert aus Mittelpunktpotentialen, welche aus 3-9 (genauer aufgeschlüsselt in Abbildung 14) Einzelerperimenten berechnet wurden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des jeweiligen Mittelwertes. Um die Kurvenverläufe zu ermitteln, wurden die Werte gemäß Gleichung 31 mit einer logarithmischen Funktion angepaßt.

IV.C.3. Vergleich scheinbarer Valenz der Ladungsverschiebung aus einer Funktionsanpassung nach Fermi vom Wild-Typ des mGAT1 mit DDN sowie DGN

Die scheinbare Valenz z_q der Ladungsverschiebung, wie sie aus der Kurvenanpassung anhand der Fermi-Gleichung (Gleichung 25) erhalten wurde, setzt sich aus der tatsächlichen Valenz der bewegten Ionen und einem Feldanteil δ des elektrischen Feldes zusammen, welches auf die Ionen wirkt (Gleichung 28).

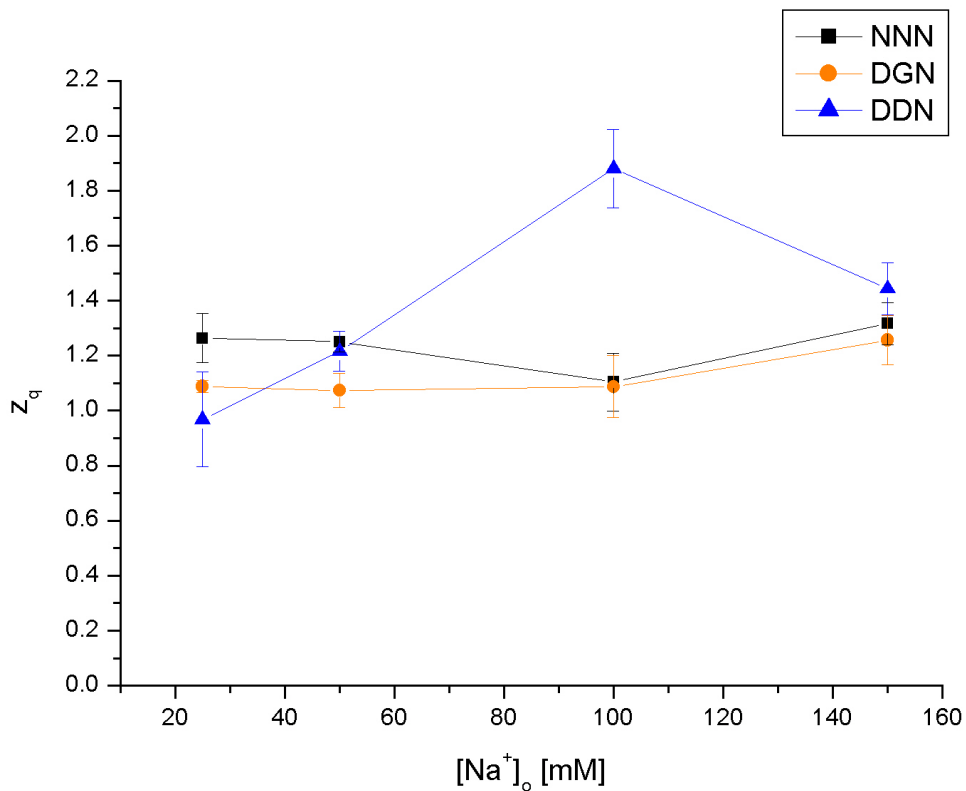


Abbildung 18: Aus der Anpassung der Ladungsverschiebungen von Abbildung 16 mit der Fermi-Gleichung (Gleichung 25) berechnete Valenz z_q , der während eines Einzelereignisses verschobenen Ladung. Die Valenzen sind hier in Abhängigkeit von den extrazellulären Natriumkonzentrationen gebracht, welche während der entsprechenden Ladungsverschiebungen vorherrschten. Die Konzentrationsabhängigkeit der Valenz sind jeweils für den Wild-Typ (schwarze Vierecke) des mGAT1 und dessen N-Glykosilierungsmutanten DGN (orange Kreise) bzw. DDN (blaue Dreiecke) als Kurven aufgetragen. Die angezeigten Werte der Kurven sind Mittelungen, welche aus von 3-9 Einzelexperimenten (genauer aufgeschlüsselt in Abbildung 14) berechneten Valenzen entstammen. Die Fehlerbalken zeigen hierbei die entsprechen Standardfehler der Mittelungen. Jedes Einzelereignis ist auf die Ladungsverschiebung eines einzelnen mGAT1 Transportproteins, welches während eines Ereignisses einen Teil des Transportzyklus durchläuft und so die Ladung $z_q \cdot e_o$ verschiebt, zurückzuführen.

Falls die scheinbare Valenz von der extrazellulären Natriumkonzentration abhängig seien sollte, kann dies im Rahmen des angenommenen Zwei-Zustände-Modells (IV.B) nur auf Grund einer Änderung des Feldanteiles δ oder aber der Valenz z zustande kommen. Letzteres ist nur möglich, wenn sich die Stöchiometrie der während des elektrogenen Reaktionsschrittes verschobenen Ionen ändern sollte.

In Abbildung 18 sind Mittelwerte der scheinbaren Valenz abgebildet, welche von angepaßten Ladungsverschiebungen aus 3-9 Einzelexperimenten gewonnen wurden, und zwar aus den selben Experimenten, welche auch Abbildung 14 zugrunde liegen. Die Standardfehler der Mittelwerte sind als Fehlerbalken dargestellt. Die Ergebnisse zeigen zumindest für den Wild-Typ des mGAT1 sowie für die N-Glykosilierungsmutante DGN einen von der extrazellulären Natriumkonzentration unabhängigen Verlauf für die scheinbare Valenz. Die Werte liegen im Mittel für den Wild-Typ mit $1,23 \pm 0,05$ ein wenig höher als für DGN mit $1,13 \pm 0,04$. Die Werte der Mutante DDN schwanken wesentlich mehr, was auf die geringe Zahl von drei Experimenten zurückzuführen ist

IV.C.4. Vergleich der in der Zellmembran exprimierten Zahl der Transportmoleküle des mGAT1

Zum einen gibt die Fermi-Gleichung (Gleichung 25), mit der die spannungsabhängigen Verläufe der Ladungsverschiebungen angepaßt wurden, anhand der Parameter des Mittelpunktspotentials V_{Mitte} sowie der scheinbaren Valenz z_q Größen an, welche die Funktionsweise des Transportmoleküls betreffen. Zum anderen läßt sich aus den Parametern Q_{min} und Q_{max} der selben Gleichung mit Hilfe von Gleichung 27 die Größe der maximal möglichen Ladungsverschiebung Q_{tot} berechnen, welche lediglich von der Anzahl der Transportmoleküle abhängt. Q_{tot} entspricht der größtmöglichen durch die Transportproteine verschiebbaren Ladungsmenge. Diese Ladungsmenge ist die Summe aus verschiebbaren Ladungen $z_q \cdot e_o$ eines Transportmoleküls. Der folgende Quotient beschreibt also genau die Anzahl N an Transportern, die sich in der Zelle am Ladungsverschiebungsprozeß beteiligen können:

$$N = \frac{Q_{tot}}{z_q \cdot e_o}$$

Gleichung 33

(der nicht am Ladungsverschiebungsprozeß beteiligte Anteil an Transportern läßt sich mit den im Experiment verwendeten Verfahren nicht bestimmen).

Es wurden mit Hilfe dieser Gleichung und der aus der Fermi-Gleichung gewonnenen Werte die Anzahl der am Ladungsverschiebungsprozeß beteiligten Transporter für jede Zelle bestimmt. Diese Werte wurden zum Vergleich für den Wild-Typ des mGAT1 sowie seinen N-Glykosilierungsmutanten gemittelt und sind in Abbildung 19 als Balkendiagramm präsentiert. Die Fehler stellen hierbei den Standardfehler des Mittelwerts dar.

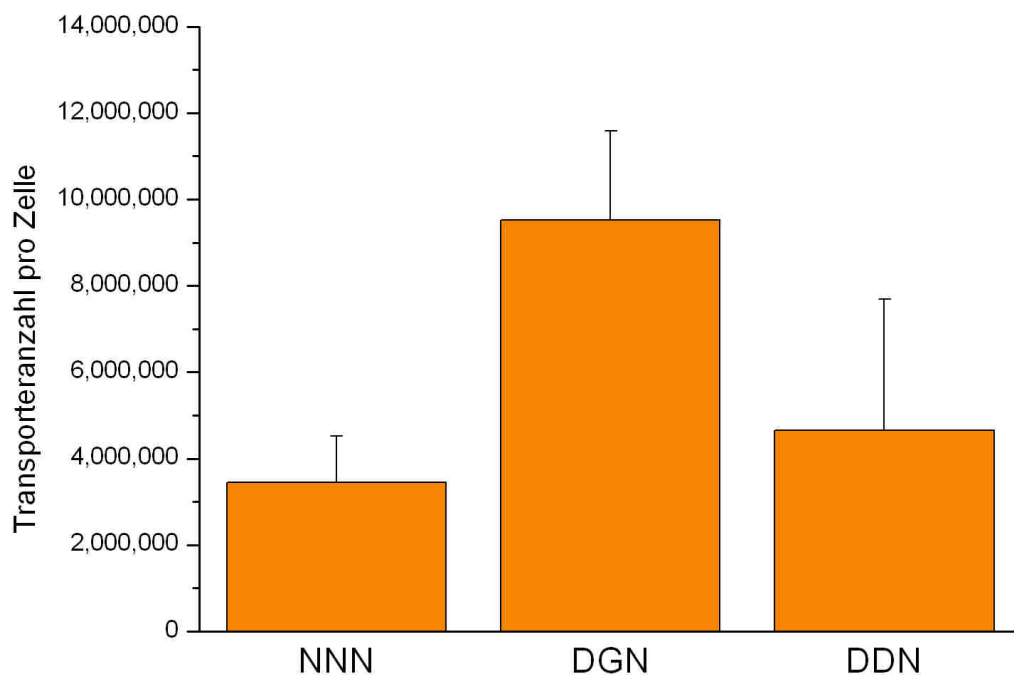


Abbildung 19: Mittlere Transporterzahl N der mGAT1-Transportproteine pro CHO-Zelle. Die Balken stehen jeweils für den Wild-Typ des mGAT1 bzw. für dessen N-Glykosilierungsmutanten. Die Transporterzahl ist zunächst für jede Zelle einzeln aus den Werten Q_{tot} und z_q anhand von Gleichung 33 berechnet worden. Q_{tot} und z_q wurden hierfür aus der Anpassung der Fermi-Gleichung an den entsprechenden potentialabhängigen Verlauf der Ladungsverschiebungen bei $[Na^+]_o = 150 \text{ mM}$ (Abbildung 16) ermittelt. Aus den so berechneten Transporterzahlen der jeweiligen Zellen wurden schließlich Mittelwerte gebildet (aus jeweils 3-9 Zellen; genauere Zuordnung siehe Abbildung 14), welche im Balkendiagramm dargestellt sind. Die aus der letzten Mittelung erhaltenen Standardfehler sind als Fehlerbalken ebenfalls im Diagramm aufgetragen.

Deutlich sieht man eine gegenüber dem Wild-Typ erhöhte Anzahl der Transporter für Zellen mit exprimierten DGN-Mutanten. Die Mutante DDN weist ebenso eine Erhöhung der Transporterzahl auf, allerdings nur tendenziell. Es muß hierbei indes, wie schon im Hinblick auf die Steady-State-Ströme in Kapitel IV.A.2, nochmals bemerkt werden, daß die Auswahl der Zellen nicht nach statistischen Kriterien stattfand, sondern nach ihrer

Fluoreszenzintensität, um eine möglichst viele Transporter exprimierende Zelle zu finden. Denn nur solche Zellen liefern ein für die Messungen genügend großes Stromsignal. Man darf also aus dem Balkendiagramm keineswegs auf eine Änderung der Expressionseigenschaft durch die Mutanten schließen, jedoch geben die Werte des Diagramms, wie wir in IV.D noch erfahren werden, eine Erklärung für den erhöhten Steady-State-Strom der DGN-Mutanten in Abbildung 14.

IV.D. Vergleich von natriumabhängigen Steady-State-Strömen pro Transportmolekül

Im vorigen Kapitel wurde erläutert, wie sich die Anzahl N der am Ladungsverschiebungsprozeß beteiligten Transporter ermitteln läßt, welche in der Membran der zu untersuchenden Zelle exprimiert sind. Anhand dieses Zahlenwertes lassen sich nun die experimentellen Daten der in Kapitel IV.A.2 beschriebenen und in Abbildung 14 dargestellten natriumabhängigen Steady-State-Ströme neu analysieren: Normiert man den Steady-State-Strom einer Zelle mit der Transporteranzahl N dieser Zelle, so erhält man einen Strom, welcher im Mittel durch ein einzelnes Transportprotein generiert wird. Dies setzt allerdings voraus, daß genauso viele Transporter am Ladungsverschiebungsprozeß beteiligt sind, wie auch an der Steady-State-Stromgenerierung. Es wird jedoch angenommen, daß die Ladungsverschiebung auf der Ligandenbindung des Natriums an das Enzym beruht (vgl. Kapitel I.A.3). Nun besteht kein ersichtlicher Grund anzunehmen, daß Enzyme, welche Natriumliganden binden, nicht auch den gesamten Transportzyklus durchlaufen können. Umgekehrt sind zwingend alle die Enzyme in der Lage, Natriumliganden zu binden, die auch einen Transportzyklus durchlaufen. Das heißt, daß der berechnete Steady-State-Strom pro Transporter seinem Betrage nach im Zweifel zu hoch, nicht jedoch zu niedrig ist.

Anhand des oben beschriebenen Normierungsverfahrens wurde der Steady-State-Strom (bei -60mV), welcher im Mittel durch **ein** Transportmolekül generiert wird, für das jeweilige Experiment berechnet. Anschließend wurde über die so berechneten Ströme aller entsprechenden Experimente gemittelt. Die Mittelwerte sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelung. Zur Normierung wurden Transporterzahlen herangezogen, welche bei einer extrazellulären Natriumkonzentration von 150mM bestimmt wurden. Man erkennt aus der Abbildung, daß die Ströme des Wild-Typs mGAT1 bei allen Natriumkonzentrationen dem Betrage nach deutlich größere Werte aufweisen als die der Mutanten. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen aus Abbildung

14, so läßt sich eine gegenteilige Tendenz ausmachen: Hier liegen fast für alle Natriumkonzentrationen die Werte der Mutanten dem Betrage nach höher als die des Wild-Typs. Auch weisen die Standardfehler meist deutlich ungünstigere Werte auf. Denn bei den Werten von Abbildung 14 fließt die unterschiedliche Expressionsrate als Fehlerquelle mit ein, welche für die Abbildung 20 wiedergegebenen Werte auf Grund der Normierung ohne Belang blieb.

Um die Ligandenbindung an ein Enzym zu charakterisieren, verwendet man in der Enzymkinetik häufig eine Darstellung, bei der die fraktionelle Sättigung gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen wird. Hierbei wird davon ausgegangen, daß das Enzym (ein Protein) aus identischen Untereinheiten (UE) besteht, wobei jede Untereinheit eine Bindungsstelle für den Liganden besitzt. Die fraktionelle Sättigung Y ist dann als folgender Quotient definiert:

$$Y = \frac{\text{Anzahl der UE, welche einen Liganden gebunden haben}}{\text{gesamte Anzahl der UE}} \quad \text{Gleichung 34}$$

Die fraktionelle Sättigung strebt für hohe Ligandenkonzentrationen einem Grenzwert (I_{\max}) entgegen. Im Falle der Natriumbindung an den mGAT1-Transporter kann man den Verlauf der fraktionellen Sättigung mit der Hill-Gleichung beschreiben:

$$Y = I_{\max} \cdot \frac{S^n}{K_{1/2}^n + S^n} \quad \text{Gleichung 35}$$

S ist die Ligandenkonzentration; $K_{1/2}$ als Konzentration der halbmaximalen fraktionellen Sättigung wird meist zur Charakterisierung der Ligandenbindungsaffinität herangezogen. n gibt die Anzahl der UE wieder.

Die Hill-Kinetik setzt eine starke, positive Kooperativität voraus; das heißt, daß die Bindung eines Liganden (Bindung des 1. Natriumions an den mGAT1) an die UE die Bindung eines gleichen Liganden an eine weitere UE (Bindung des 2. Natriumions an den mGAT1) stark begünstigt.

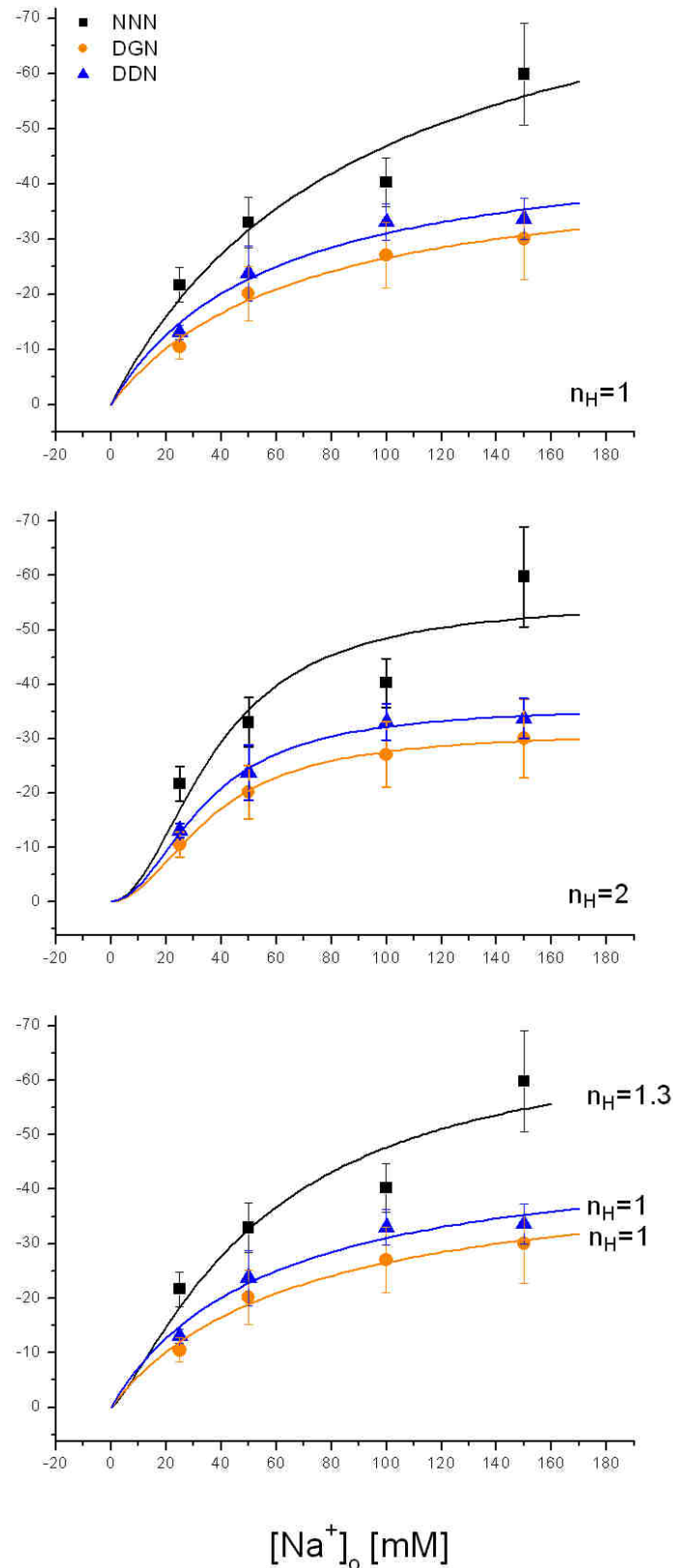
GABA-induzierter Strom pro Transporter [e_0/s]


Abbildung 20: GABA-induzierter Transportstrom **eines** Transportproteins in Abhängigkeit der extrazellulären Natriumkonzentration. Der Strom wurde bei einem Haltepotential von -60 mV aufgenommen und ist in einem Vielfachen der Einheitsladung e_0 pro Sekunde angegeben. Um den Transportstrom **eines** Transportproteins zu ermitteln, wurde der an der jeweiligen Zelle gemessene GABA-induzierte Strom (vgl. Abbildung 14) durch die berechnete mGAT1-Transporterzahl (vgl. Gleichung 33) der Zelle (bei 150 mM $[Na^+]_o$) dividiert. Die so errechneten Werte sind über alle Zellen (jeweils 3-9 Zellen; genauere Zuordnung siehe Abbildung 14) gemittelt und in den Graphen dargestellt, wobei die Fehlerbalken den Standardfehler repräsentieren. Die drei Graphen zeigen jeweils die gleichen Stromwerte. Allerdings unterscheiden sie sich in den angepassten Kurvenverläufen. Die Anpassungen anhand der Hill-Funktion (Gleichung 35) wurden unter unterschiedlichen Annahmen für den Hill-Koeffizienten (n_H) vollzogen. Die aus der Anpassung ermittelten Werte finden sich im Text.

Häufig läßt sich die fraktionelle Sättigung aber nicht durch ein ganzzahliges n beschreiben. In diesem Fall trifft die Voraussetzung einer starken positiven Kooperativität nicht zu. Man spricht deshalb vom Hill-Koeffizienten n_H , welcher nicht mehr die Anzahl der UE wiedergibt, sondern nur noch ein qualitatives Maß für die Wechselwirkung der UE darstellt. Im Falle $n_H > 1$ kann jedoch von einer zumindest positiven Kooperativität ausgegangen werden.

Der Steady-State-Strom des mGAT1 verhält sich nun proportional zur fraktionellen Sättigung Y , da nur diejenigen Transportmoleküle zum Steady-State-Strom beitragen, welche auch Liganden gebunden haben. Den natriumabhängigen Steady-State-Stromverlauf aus Abbildung 20 kann man somit unter Annahme der oben beschriebenen Voraussetzungen durch die Hill-Gleichung anpassen:

Die Abbildung vergleicht Anpassungen der Verläufe, wobei in jedem der drei Graphen jeweils andere Hill-Koeffizienten als gegeben vorausgesetzt wurden. Es fällt auf, daß sich Verläufe mit $n_H=2$ (mittlerer Graph) ebenso gut an die Werte angleichen lassen, wie Verläufe mit $n_H=1$ (oberer Graph). In Folgender Tabelle sind die aus den Funktionsanpassungen ermittelten Werte aufgeführt:

<i>K_{1/2}-Werte [mM]</i>	<i>n_H=1</i>	<i>n_H=2</i>	<i>n_H=1,3</i>
NNN	93 ± 35	38 ± 8	55 ± 25
DGN	68 ± 44	36 ± 13	
DDN	57 ± 31	34 ± 10	

<i>I_{max}-Werte [e_o/s]</i>	<i>n_H=1</i>	<i>n_H=2</i>	<i>n_H=1,3</i>
NNN	-91 ± 6	-55 ± 3	-70 ± 4
DGN	-45 ± 3	-31 ± 2	
DDN	-49 ± 3	-36 ± 2	

Die in der Tabelle angegebenen Fehler geben nicht, wie sonst in dieser Arbeit, den Standardfehler wieder, sondern einen Bereich, innerhalb dessen die Werte der jeweiligen Parameter variieren können, ohne die erzielte Genauigkeit der Funktionsanpassung zu beeinträchtigen¹.

Die in der Tabelle aufgeführten $K_{1/2}$ -Werte für den Wild-Typ und die Mutanten ließen sich

¹ An dieser Stelle soll erwähnt werden, daß sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten Funktionsanpassungen mit den Routinen des Origin7.0-Programmes (OriginLab Corp., Northampton, USA) durchgeführt wurden.

sowohl für $n_H=1$, als auch für $n_H=2$ nur sehr ungenau bestimmen und weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Die I_{max} -Werte hingegen konnten recht gut bestimmt werden: Die Werte der Mutanten sind hierbei um mehr als 46% ($n_H=1$) bzw. 35% ($n_H=2$) gegenüber dem Wert des Wild-Typs reduziert. Um die tatsächlichen n_H -Werte anhand einer Funktionsanpassung der Hill-Gleichung bestimmen zu können, müßten mehr Datenpunkte bei unterschiedlichen Natriumkonzentrationen vorliegen. Dies jedoch ließ sich im Rahmen der hier durchgeführten Messungen nicht realisieren. Allerdings konnten für die Funktionsanpassung Werte von Liu *et al.* [1998] übernommen werden, die für den Wild-Typ einen Wert von $n_H=1,3$ und für DDN einen Wert von $n_H=1$ errechneten. Mit Hilfe dieser Werte und unter der Annahme, daß die Mutante DGN den gleichen Hill-Koeffizienten aufweist wie DDN, wurden die im letzten Graphen der Abbildung 20 dargestellten Kurven angepaßt. Die hierdurch gewonnenen $K_{1/2}$ -Werte für den Wild-Typ und die Mutanten ließen sich ebenfalls recht ungenau bestimmen. Allerdings boten auch hier die I_{max} -Werte der Mutanten gegenüber dem Wert des Wild-Typs eine Reduktion um 30%.

Es läßt sich so zusammenfassend festhalten, daß zwar über die $K_{1/2}$ -Werte keine Aussage getroffen werden kann, daß aber sowohl die gemessenen Transportströme als auch die aus der Funktionsanpassung gewonnenen I_{max} -Werte der N-Glykosilierungsmutanten gegenüber denen des Wild-Typs deutlich reduziert sind.

IV.E. Vergleich potentialabhängiger Steady-State-Stromverläufe eines Transportermoleküls bei verschiedenen Natriumkonzentrationen

Die im vorherigen Kapitel verglichenen Steady-State-Ströme wurden bei einem elektrischen Potential von -60mV gemessen. Um den Vergleich von Strömen auf weitere Potentiale ausweiten zu können, bedarf es der in Kapitel IV.A.2 behandelten und in Abbildung 13 dargestellten normierten potentialabhängigen Steady-State-Stromverläufe. Diese potentialabhängigen Verläufe sind unabhängig von der Zahl der in der Membran exprimierten Transporter. Multipliziert man ihre Werte mit den entsprechenden im vorigen Kapitel behandelten Steady-State-Stromwerten eines Transportmoleküls, dann erhält man den potentialabhängigen Steady-State-Stromverlauf, welcher im Mittel von **einem** Transportmolekül generiert wird. Die Multiplikation kann ohne weitere Faktoren durchgeführt werden, weil die Verläufe bei einem Potential von ebenfalls (s.o.) -60mV auf den Wert 1 normiert wurden. Die im vorigen Kapitel gemachten Annahmen gelten natürlich

auch hier als Voraussetzung. In Abbildung 21 sind die Neuberechneten Verläufe gezeigt. Die Fehlerbalken entsprechen Fehlern, welche nach den Gesetzen der Fehlerfortpflanzung aus den Standardfehlern der Mittelwerte berechnet wurden.

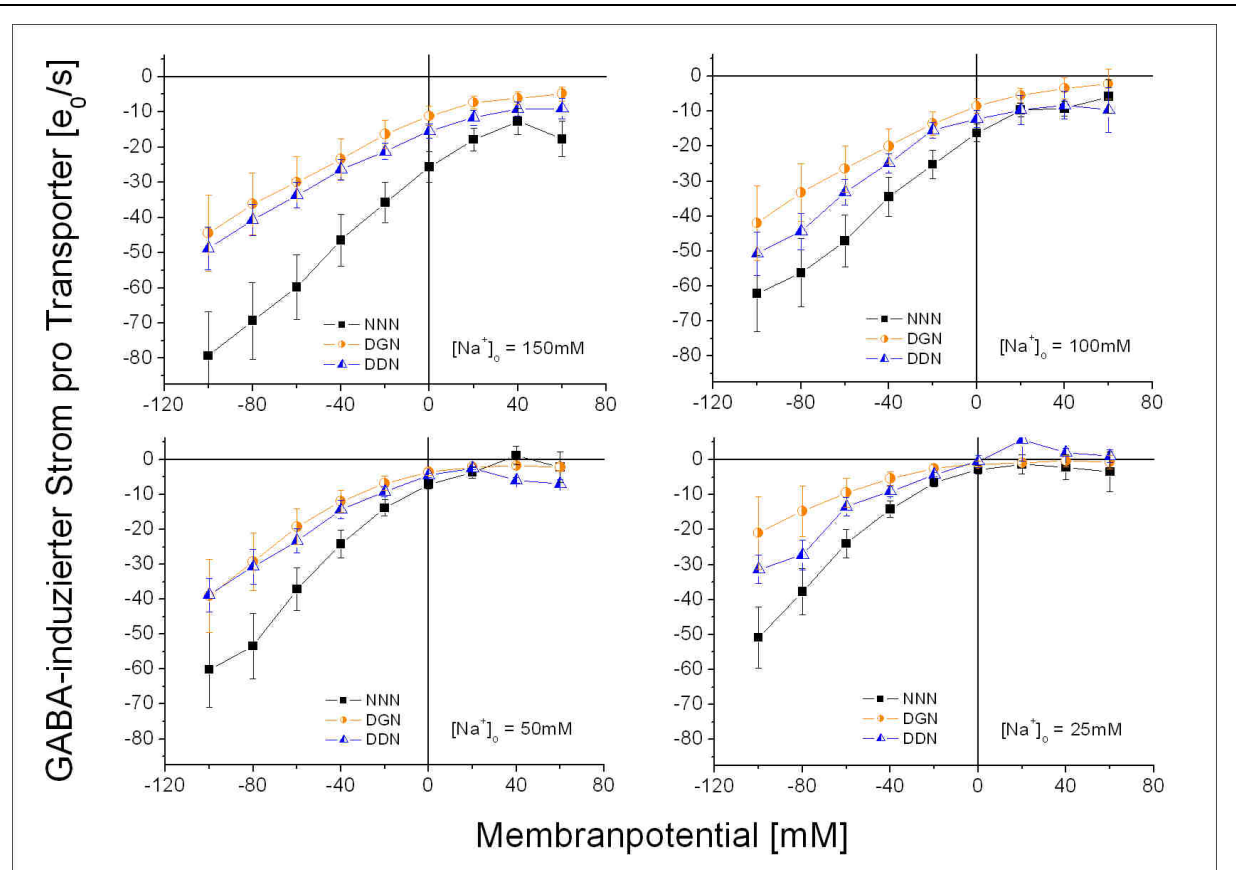


Abbildung 21: Strom-Spannungsverlauf GABA-induzierter Steady-State-Ströme eines Transportproteins. Der Strom ist in Vielfachen von der Einheitsladung e_0 pro Sekunde angegeben. Die 4 Graphen der Abbildung zeigen jeweils Werte bei einer bestimmten extrazellulären Natriumkonzentration. Zur Berechnung der Strom-Spannungsverläufe wurden die normierten Ströme aus Abbildung 13 mit den Strömen in Abbildung 20 multipliziert.

Die Stromverläufe der N-Glykosylierungsmutanten des mGAT1 zeigen in fast allen Fällen eine gegenüber dem Wild-Typ um einen Faktor von etwa $\frac{1}{2}$ reduzierte Abhängigkeit. Eine Ausnahme bildet hierbei der Stromverlauf der Mutanten DGN bei einer Natriumkonzentration von 100mM. Er zeigt eine gegenüber dem Wild-Typ verstärkte Abhängigkeit. Seine Mittelwerte weisen allerdings auch wesentlich größere Fehler als die der anderen Verläufe auf.

IV.F. Einfluß der dMM-Behandlung der Zellen auf Steady-State-Ströme des mGAT1

Die bisherige Analyse konzentriert sich auf den Vergleich von Daten, welche aus mit mGAT1 transfizierten Zellen gewonnen wurden, mit anderen Daten von mit N-Glykosilierungsmutanten transfizierten Zellen. Die Annahme ist hierbei, wie in Kapitel I.A.4 erläutert, daß durch die Punktmutationen an den N-Glykosilierungsstellen die Glykosilierung dieser Stellen verhindert wird. Ob jedoch die unterschiedlichen Effekte, die beim Vergleich von Messungen am Wild-Typ und an den N-Glykosilierungsmutanten auftraten, auf die nicht mehr vorhandenen Oligosaccharide an den N-Glykosilierungsstellen zurückzuführen sind oder aber auf eine andere Wirkung der Mutation, sollte durch folgende Experimente geklärt werden:

CHO-Zellen wurden ab Beginn der DNA-Transfektion mit dem Wild-Typ mGAT1 bis zu den Messungen in 2mM Deoxymannojirimycin (dMM) inkubiert. dMM wurde zu diesem Zwecke dem Kulturmedium hinzugegeben. dMM ist ein Mannosidaseinhibitor und soll die Glykosilierungsprozessierung ebenfalls verhindern bzw. verändern (vgl. Kapitel I.B sowie [Vallee *et al.* 2000]). Der Umstand, daß die dMM-Inkubation die Zellen häufig schädigte, führte letztlich zu einer nur geringen Zahl geglückter Experimente mit dMM. Zudem hielten die untersuchten Zellen der Tortur nicht lange stand, wodurch zeitaufwendigere Messungen mit unterschiedlichen Natriumkonzentrationen unmöglich waren. Zudem waren die Ströme im zeitlichen Verlauf sehr instabil, weshalb nur Steady-State-Messungen durchgeführt werden konnten, jedoch keine transienten Ströme analysiert wurden.

Die GABA-induzierten Steady-State-Ströme wurden dabei genauso aufgenommen und analysiert wie in den Experimenten zuvor geschehen.

Da keine transienten Ströme analysiert wurden, konnte auch keine Transporteranzahl der Zellen bestimmt werden, weshalb kein Steady-State-Strom pro Transporter ermittelt wurde. Vielmehr wurden die GABA-induzierten Steady-State-Stromverläufe normiert; danach wurden die Werte der Verläufe über alle Zellen gemittelt und schließlich die für die Normierung verwandten Stromwerte ebenfalls gemittelt: dieser Wert wurde dann mit den Werten der Verläufe multipliziert.

Ebenso wurde mit den Daten von nicht dMM-inkubierten und Wild-Typ-transfizierten Zellen verfahren, die zum Vergleich mit den Daten der dMM-inkubierten Zellen herangezogen wurden. Der Vergleich ist in Abbildung 22 durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen einem Standardfehler gemäß der Fehlerfortpflanzung. Im Falle der dMM-Inkubation wurden Werte aus Messungen an 2 Zellen gemittelt, im anderen Falle Werte aus Messungen an 9 Zellen.

Trotz großer Streuung der Werte der dMM-inkubierten Zellen kann man erkennen, daß bei negativen Potentialen auf Grund der vorherigen dMM-Inkubation die Potentialabhängigkeit

des GABA-induzierten Steady-State-Stromverlaufs um mindestens den Faktor $\frac{1}{2}$ reduziert wird. Bei positiven Potentialen zeigen die Mittelwerte sogar einen Auswärtsstrom. Die Mittelwerte des Auswärtsstroms sind jedoch mit einem sehr großen Fehler behaftet, weshalb keine Aussage über das Auftreten eines Auswärtsstroms gemacht werden kann.

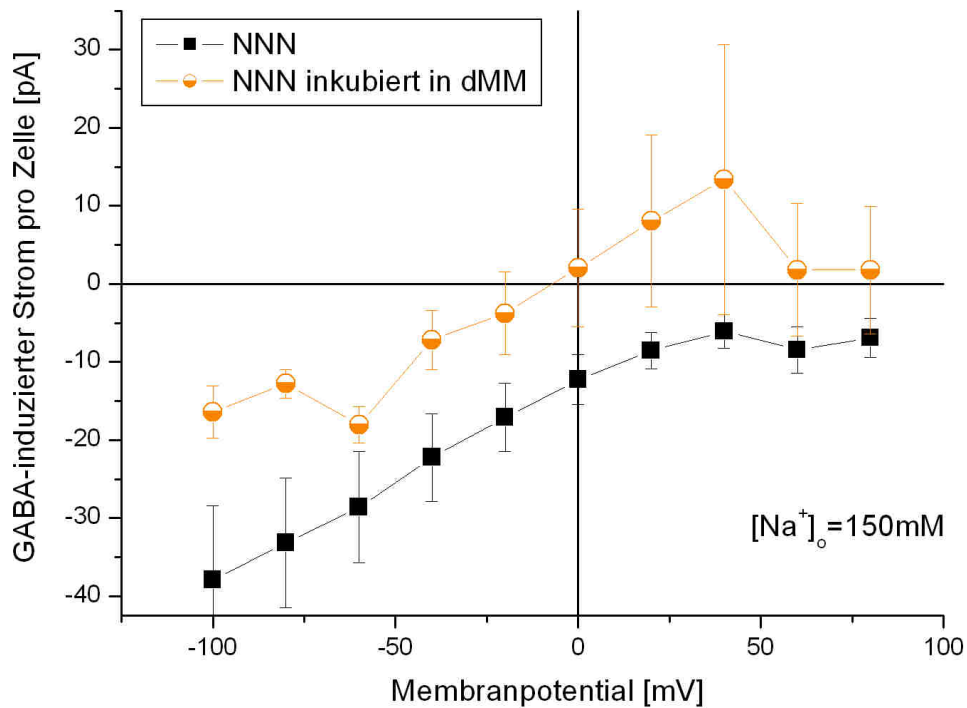


Abbildung 22: Vergleich von Strom-Spannungskurven GABA-induzierter Steady-State-Ströme des Wild-Typ mGAT1 von CHO-Zellen mit (orange Kreise) und ohne (schwarze Vierecke) Inkubation in 2 mM Mannosidaseinhibitor Deoxymannojirimycin (dMM). Die gemittelten Werte für die Kurve der in dMM inkubierten Zellen stammen lediglich aus 2 Experimenten, die für die Kurve der nicht-inkubierten Zellen aus 9 Experimenten. Die Ströme wurden bei 150mM extrazellulärer Natriumkonzentration aufgenommen.

V. Diskussion

V.A. Einfluß der N-Glykosylierung auf die GAT-1-Expression

Die durch die N-Glykosylierung im sekretorischen Weg der Proteinbiosynthese an das Protein angebrachten Oligosaccharide spielen eine entscheidende Rolle in der Strukturbildung der Proteine, aber auch während des Proteineinbaus in die Membran, wie ausführlich im Einführungsteil dieser Arbeit erläutert. Will man nach einem funktionellen Einfluß der N-Glykosylierung auf das GAT-1-Protein suchen, stellt sich als einfachste und zunächst naheliegendste Untersuchungsmethode jene dar, welche einem die Beobachtung des Einstroms von GABA und der Coionen in die Zelle erlaubt. Die hier einschlägige Methode mißt die Aufnahme von radioaktiv markiertem GABA bzw. die der radioaktiv markierten Coionen in mit GAT-1 exprimierten Zellen. Derartige „Flux“-Messungen wurden, wie schon im Einleitungsteil (vgl. Kapitel I.A.4 sowie I.B) erwähnt, an Oozyten von Liu *et al.* [1998] sowie an CHO-Zellen von Cai *et al.* [2001] durchgeführt, und die Autoren beider Arbeiten konnte eine starke Reduktion des in die Zellen einströmenden [³H]GABAs verzeichnen, sofern sie ihre Aufnahmewerte vom Wild-Typ des GAT-1 mit denen der N-Glykosylierungsmutanten verglichen. Ob sich die reduzierten Werte bei den Mutanten auf eine beeinträchtigte Funktionalität der Transportproteine zurückführen ließen, konnte jedoch allein aus den Analysen der Flux-Messungen nicht abgelesen werden. Die Ursache für die Reduktion könnte auch in einer geänderten Anzahl in der Membran exprimierter Proteine liegen, so daß es zur Klärung einer Heranziehung anderer Meßmethoden bedurfte, welche die Anzahl jener in der Membran exprimierten Proteine zu bestimmen gestatteten.

Für diesen Zweck boten sich Messungen transients Ladungsverschiebungen bei den mit GAT-1 exprimierten Oozyten an, die mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden von Liu *et al.* ausgeführt wurden und aus denen sich die Gesamtzahl funktionell exprimierter Transporter berechnen ließ (vgl. hierzu IV.C.4). Es ergab sich, daß die Oozyten im Vergleich zum Wild-Typ des GAT-1 genausoviel funktionelle DDN-Mutanten und sogar doppelt soviel DND-Mutanten exprimierten. Dieser Umstand konnte demnach kaum als eine Ursache für die reduzierte [³H]GABA-Aufnahme in Anspruch genommen werden, weil für eine solche Inanspruchnahme ebenfalls eine durch die Mutationen verursachte Reduktion in der Gesamtzahl funktionell exprimierter Transporter nötig gewesen wäre. Als Ursache bleibt somit nun einzig eine geänderte Funktion des GAT-1.

Bei Betrachtung der Messungen an CHO-Zellen ergibt sich ein ähnliches Bild: Die in der Arbeit von Cai *et al.* aufgewiesenen Effekte zeigen eine gegenüber dem Wild-Typ um etwa das Fünffache reduzierte [^3H]GABA-Aufnahme der N-Glykosilierungsmutanten DGN und DDN. Um als Ursache dieser Reduzierung eine veränderte Gesamtzahl funktionell exprimierter Transporter sehen zu wollen, müßte diese Gesamtzahl im Falle der Mutanten reduziert sein. Die Analysen der hier vorliegende Arbeit über die Gesamtzahl lassen einen solchen Zusammenhang jedoch nicht vermuten. Diese Analysen, welche auf elektrophysiologischen Experimenten an CHO-Zellen fußen, ergeben eine für die Mutanten im Vergleich zum Wild-Typ erhöhte Gesamtzahl an funktionell exprimierten Transportern, wobei die Erhöhung im Fall der Mutanten DDN leicht und im Fall der Mutanten DGN stark ausgeprägt ist. Die Ergebnisse der Gesamtzahlmessungen stammen aus der Ermittlung transienter Ladungsverschiebungen an GAT-1 exprimierten Zellen in Abwesenheit von GABA und sind in Abbildung 19 abgebildet. Es muß jedoch unbedingt darauf hingewiesen werden, daß solche Ergebnisse anhand von Zellen gewonnen wurden, welche nach dem Kriterium der besten GAT-1-Expression ausgesucht wurden. Es handelt sich somit um keine statistisch zufällige Auslese, wie sie für eine Beurteilung der Gesamtzahl eigentlich von Nöten wäre. Dennoch kann die Feststellung getroffen werden, daß durch eine beeinträchtigte N-Glykosilierung des GAT-1 im Fall der bemessenen Zellen keine Reduktion funktionell exprimierter Transporter beobachtet werden konnte. So ist auch hier zumindest ein gewichtiger Anhaltspunkt dafür gegeben, daß die bei Cai *et al.* gemessene Reduktion der [^3H]GABA-Aufnahme auf eine funktionelle Änderung des GAT-1 zurückzuführen ist. Im folgenden soll die Annahme einer funktionellen Änderung durch die Betrachtung weiterer elektrophysiologischer Experimente noch untermauert werden.

V.B. Einfluß der N-Glykosilierung auf Transportströme im elektrochemischen Gleichgewicht

Im elektrochemischen Gleichgewicht generieren Zellen, welche den GAT-1-Transporter oder auch die N-Glykosilierungsmutanten desselben exprimiert haben, bei Anwesenheit von GABA einen kontinuierlichen elektrischen Strom über die Zellmembran, den sog. GABA-induzierten Steady-State-Strom. Dieser Strom kann unter Beachtung der bereits in Kapitel II.C.2.a) besprochen Forderungen als vom GABA-Transporter generierter Strom angesehen werden. Er ist zunächst auf den durch die Stöchiometrie beschriebenen Transport der Coionen

über die Membran zurückzuführen sowie vielleicht auch zu einem gewissen Anteil auf eine nicht durch die Stöchiometrie zu beschreibende zusätzliche Leitfähigkeit, welche einem sonst bei Ionenkanälen begegnet (vgl. hierzu Kapitel I.A.3). Wie immer sich der Strom auch anteilig zusammensetzen mag, so spiegelt er doch in jedem Falle die Funktionsweise des GAT-1 wider, und eine Beobachtung desselben ermöglicht es uns, Veränderungen in der Transportfunktion auszumachen. Der Strom sollte im übrigen nicht als nebensächliche Begleiterscheinung des Transportvorgangs verstanden werden, denn die über die Membran verschobenen Ladungen, welche die Ursache dieses Stroms darstellen, repräsentieren ein für die funktionelle Regulation wichtiges Mittel, mit Hilfe dessen unter anderem das elektrische Potential die Transportrate zu verändern mag. Ob diese regulatorische Option physiologisch von Bedeutung ist, wurde bisher nicht erforscht.

Eine Beeinträchtigung der Funktionsweise des Transportprozesses durch Mutationen der N-Glykosilierungsstellen des GAT-1, wie es die Ausführungen des letzten Kapitels vermuten lassen, sollte sich gewiß in den Steady-State-Strömen äußern. Bei der Betrachtung dieser Ströme spielen zwei Gesichtspunkte eine wichtige Rolle: Zum einen erlaubt der potentialabhängige Verlauf der Ströme, sofern sie in ihrer Amplitude normiert wurden, die Reaktion des Transportzyklus auf ein geändertes elektrochemisches Potential zu verfolgen. Zum anderen gewährt die Analyse der Stromamplituden Einblicke in Transportrate und Proteinexpression. Das Spektrum der Betrachtung wird indes noch reichhaltiger, wenn das über die Membran anliegende elektrochemische Potential durch verschiedene extrazelluläre Na-Konzentrationen variiert wird, um so unter anderem die Bindungsaffinität des für den Transportprozeß unerläßlichen Natriums zu verfolgen.

V.B.1. Potentialabhängige normierte Verläufe

Betrachten wir zuvorderst den potentialabhängigen Verlauf der Ströme:

Im Rahmen dieser Arbeit wurden potentialabhängige Verläufe von Steady-State-Strömen untersucht, welche durch GAT-1 bzw. dessen N-Glykosilierungsmutanten generiert wurden. Zunächst wurden jene Verläufe normiert, um den Einfluß der Expression und des potentialunabhängigen Anteils der Transportrate zu beseitigen. Die so normierten Verläufe werden in Abbildung 13 miteinander verglichen, und es zeigen sich keine nennenswerten Unterschiede im potentialabhängigen Verlauf des Wild-Typs und seiner Mutanten. Auch bei Erniedrigungen der extrazellulären Natriumkonzentrationen, welche die Transportrate des GABA-Transporters deutlich zu drosseln vermochten, zeigen sich im Verlauf dennoch keine

signifikanten Unterschiede zwischen Wild-Typ und Mutanten. Es kann somit keine durch die N-Glykosilierungsmutation beeinflusste Natriumabhängigkeit des potentialabhängigen Anteils der Transportrate festgestellt werden.

Hingegen konnten Liu *et al.*, welche ebenfalls Steady-State-Ströme an mit GAT-1-Wild-Typ und N-Glykosilierungsmutanten DDN sowie DND exprimierten Oozyten untersuchten, Unterschiede in den normierten Verläufen ausmachen. Sie erhielten aus ihren Verläufen geänderte $K_{1/2}$ -Werte für Natrium vor allem für positive Potentiale. Auch für vorliegende Arbeit wurden $K_{1/2}$ -Werte für Natrium ermittelt (vgl. Tabelle in Kapitel IV.D). Jedoch sind die Werte zu sehr mit Fehlern behaftet, als daß sie Unterschiede zwischen den Werten des Wild-Typs und der Mutanten sicher erkennen ließen. Im Falle von Liu *et al.* bedurften vor allem bei positiven Potentialen die mutierten GABA-Transporter wesentlich mehr extrazellulären Natriums, um eine halbmaximale Transportrate zu erreichen als der Wild-Typ-Transporter. Aus diesem Umstand kann auf eine durch die Mutation herabgesetzte scheinbare Natriumbindungsaffinität im Sinne einer Hill-Kinetik für das Transportprotein geschlossen werden. Aus den Daten der hier vorliegenden Arbeit kann ein derartiger Schluß jedoch nicht gezogen werden, so daß die Frage aufkommen muß, wie sich eine solche Diskrepanz in den Resultaten erklären läßt:

Zu bedenken ist in diesem Zusammenhang: Zum einen wurden verschiedene Expressionssysteme verwandt, wodurch auf Grund möglicherweise andersartiger Proteinbiosynthese strukturelle Unterschiede sowie Unterschiede in der Glykosilierung zwischen GAT-1 Proteinen der Oozyten und der CHO-Zellen vorliegen könnten oder aber auf Grund unterschiedlicher zytoplasmatischer Regulationsmechanismen das Transportverhalten des GAT-1 verändert wird.

Zum anderen herrschten intrazellulär jeweils andere Bedingungen. Bleibt das Zytosol der Oozyten bei den Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Experimenten von Liu *et al.* erhalten, so wird es bei den CHO-Zellen der Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Experimente dieser Arbeit wegen durch eine definierte intrazelluläre Pipettenlösung ausgetauscht. So liegen in beiden Fällen andere Chloridkonzentrationen vor: Die physiologische Chloridkonzentration des Oozytenzytosols beträgt etwa 40-50mM [Jaffe *et al.* 1985] und ist damit um eine Größenordnung höher als jene der für die CHO-Zellen verwendeten Konzentration von 4mM. Hierdurch läßt sich auch erklären, weshalb im Falle von 100mM NaCl die Verläufe bei Liu *et al.* im Bereich der positiven Potentiale kaum noch einen Transportstrom aufweisen, während bei den Verläufen der hier vorgelegten Arbeit im gleichen Potentialbereich ein Transportstrom noch recht deutlich auszumachen ist.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß auch im Falle der CHO-Zellen Änderungen in den Verläufen zwischen Wild-Typ und Mutanten des GAT-1 hätten sichtbar werden können, wenn Messungen in einem negativeren Potentialbereich als -100mV getätigt worden wären, wie dies auch für die Oozyten bei Liu *et al.* geschah. Ebenso hätten vielleicht Messungen bei weiteren Natriumkonzentrationen Änderungen in der scheinbaren Natriumbindungsaffinität ans Licht gebracht, indem über die Darstellung Na^+ -abhängiger Transportströme (wie in Abbildung 20) $K_{1/2}$ -Werte für Natrium genauer bestimmt worden wären. Jedoch ließen dies die experimentellen Bedingungen mit ihrer erforderlichen Natriumkonzentrationsbeschränkung nicht zu.

Man kann mithin als Ergebnis der bisherigen Diskussion festhalten, daß zumindest im Fall der CHO-Zellen die durch Mutation beeinträchtigte Glykosilierung des GAT-1 keinen solchen Einfluß auf die Potentialabhängigkeit der GAT-1-Transportprozesses auszuüben vermag, welcher groß genug wäre, um als Ursache für von Cai *et al.* gesehenen Effekte bei Uptake-Messungen herangezogen werden zu können. Weiterhin zeigt sich die scheinbare Natriumbindungsaffinität des GAT-1, über die bereits Mager *et al.* [1993] sagen konnten, daß sie potentialabhängig sei, bei den CHO-Zellen von einer veränderten Glykosilierung des GAT-1 unbeeindruckt. Der Frage, ob sich nun die Effekte der Uptake-Messungen durch Unterschiede in den nicht-potentialabhängigen Stromanteilen der gemessenen Steady-State-Ströme deuten lassen, soll im nächsten Kapitel nachgegangen werden.

V.B.2. Stromamplituden und Transportraten

An den normierten potentialabhängigen Verläufe der Steady-State-Ströme konnten keine Effekte der N-Glykosilierung ausgemacht werden. Da jedoch ein Einfluß der Glykosilierung auf die Steady-State-Ströme, wie ihn ja auch Liu *et al.* sehen konnten, zu erwarten ist, wenden wir uns jetzt der Betrachtung der Absolutwerte der Steady-State-Ströme, also den Amplituden der unnormierten Stromverläufe, zu. Hierbei ist es unerheblich, welche Potentiale mit zugehörigen Amplituden zum Vergleich herangezogen werden, da eben die Potentialabhängigkeit der Verläufe unbeeinflusst bleibt. Ein interessantes Bild ergibt sich, wenn man die Stromamplituden von GABA-induzierten Steady-State-Strömen vergleicht, wenn diese unnormiert den mittleren Transportstrom über eine ganze Zelle wiedergeben. Der in Abbildung 14 vorgenommene Vergleich zeigt ein den Resultaten der Uptake-Messungen widersprechendes Verhalten: So weisen die N-Glykosilierungsmutanten tendenziell höhere Transportströme auf als der Wild-Typ, obwohl dies im Falle der $[^3\text{H}]$ GABA-Aufnahme bei

den Uptake-Messungen von Liu *et al.* sowie Cai *et al.* genau entgegengesetzt ist. Schnell jedoch löst sich der Widerspruch auf, sofern die Auswahlkriterien für die Zellen mit berücksichtigt werden, wie bereits in Kapitel IV.A.2 besprochen. Weil aber die Auswahl nach dem Kriterium der höchsten Transporterexpression geschieht, wie es die Erfordernisse der experimentellen Durchführung verlangen, genügt diese Auswahl eben nicht statistischen Kriterien. Dieses Dilemma läßt sich galant umschiffen, indem man die gemessenen Stromamplituden ganzer Zellen auf solche einzelner Transporter zurückführt, um so eine Grundlage für weitere Vergleiche zu schaffen. Hierfür benötigt man die Anzahl der in der Zelle funktionell exprimierten GAT-1-Transporterproteine, welche dann zur Normierung der Amplituden herangezogen wird. Besagte Anzahl (Abbildung 19) konnte für jede einzelne Zelle aus den im späteren vorgestellten transienten Strömen recht gut bestimmt werden. Die Normierung unterstellt natürlich, daß eine Änderung der Transporterdichte in der Membran die Transportrate der selben Transporter nicht zu verändern vermag. Mager *et al.* [1998] konnten dies indes schon zeigen, so daß ein lineares Verhältnis zwischen Transporterdichte und Transportstrom als gegeben vorausgesetzt werden darf.

Ein Vergleich nun eben der auf einzelne Transporter zurückgeführten Stromamplituden, wie er in Abbildung 20 vorgenommen ist, erbrachte das erwartete Resultat: Im Gegensatz zu Abbildung 14 weisen nämlich die Stromamplituden der N-Glykosilierungsmutanten eine deutliche Reduktion gegenüber denen des Wild-Typs auf. Die quantitative Erfassung dieser Reduktion soll im folgenden erläutert werden:

Eine Abhängigkeit zwischen Enzymaktivität und Ligand, wie sie in Abbildung 20 durch Transportrate und Natriumkonzentration dargestellt wird, kann in der Enzymkinetik unter bestimmten Voraussetzungen mit Hilfe einer Hill-Kinetik beschrieben werden (vgl. Kapitel IV.D). Eine Kurvenanpassung der Werte konnte mit Hilfe der Hill-Gleichung sowohl für einen Hill-Koeffizient von $n_H=1$ als auch $n_H=2$ durchgeführt werden, ohne daß sich qualitative Unterschiede bemerkbar gemacht hätten. Auch das Einsetzen von Werten wie $n_H=1.3$ für NNN und $n_H=1$ für DDN (in der Literatur bei Liu *et al.* [1998]) konnte keine Verbesserung erzielen. Die sich aus der Kurvenanpassung ergebenden $K_{1/2}$ -Werte (vgl. Tabelle in Kapitel IV.D), welche schon im vorherigen Kapitel diskutiert wurden, waren in allen drei Beispielen zu sehr mit Fehlern behaftet, als daß Unterschiede zwischen ihnen hätten ausmacht werden können. Dennoch ergab sich in allen drei Beispielen der Kurvenanpassung für I_{\max} die gleiche eindeutige Tendenz:

Die I_{\max} -Werte (vgl. Tabelle in Kapitel IV.D), welche bei einem Haltepotential von -60mV den maximal möglichen Transportstrom beschreiben, der durch ein Transportprotein in Mittel

erzeugt werden kann, zeigen je nach Beispiel eine durch die beeinträchtigte N-Glykosilierung verursachte Reduktion von 30% - 46%. Diese Reduktion kann somit zumindest für einen Teil der bei Uptake-Messungen auftretenden Reduktion verantwortlich gemacht werden. Der geschilderte Zusammenhang wird um einiges klarer, wenn man sich vor Augen führt, daß der in Abbildung 20 getätigte Vergleich zudem einen Vergleich der Transportraten enthält: Die in der Abbildung gezeigten Stromamplituden sind nämlich in der Einheit e_0/s angegeben. Weil aber nach bisherigen Stöchiometrieauffassungen gemäß Keynan und Kanner [1988] eine bzw. nach Loo *et al.* [2000] zwei Einheitsladungen pro Transportzyklus transportiert werden, entspricht der Amplitudenwert das eine Mal genau und das andere Mal der Hälfte der Transportrate [1/s].

Führt man die Absolutwerte der Transportraten mit den potentialabhängigen normierten Verläufen der Steady-State-Ströme aus Abbildung 13 zusammen, so erhält man Verläufe (Abbildung 21), welche die Abhängigkeit der Transportraten vom elektrischen Potential wiedergeben. Für die Ergebnisse der Steady-State-Messungen sei zusammenfassend gesagt, daß eine beeinträchtigte N-Glykosilierung des GAT-1 zu einer Reduktion der Transporterrate führt, wodurch sich natürlich die Reduktion der GABA-Aufnahme bei Uptake-Messungen auf das Vortrefflichste erklären ließe, zumindest zu einem wesentlichen Teil. Desweiteren liegt eine veränderte Expression als zusätzliche Ursache reduzierter GABA-Aufnahme durchaus im Bereich des Möglichen; jedoch läßt sich ein derartiger Einfluß im Rahmen der hier durchgeführten Messungen nicht nachvollziehen. Liu *et al.* betrachteten ebenfalls Transportströme bei -60mV, doch waren diese seltsamerweise nicht, wie aus ihren eigenen Uptake-Messungen bei gleichbleibender Stöchiometrie des GAT-1 zu erwarten, durch die beeinträchtigte N-Glykosilierung erniedrigt, sondern sogar teilweise erhöht. Allerdings führten sie ihre Ströme auch nicht auf einen einzelnen Transporter zurück, so daß einem Vergleich mit Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit die Grundlage fehlt.

V.C. Einfluß auf transiente Ströme in Abwesenheit von GABA

V.C.1. Zeitkonstanten

Sucht man nach den Gründen für die im vorherigen Kapitel beschriebene Reduktion der Transportrate des GAT-1, welche zunächst durch eine beeinträchtigte N-Glykosilierung veranlaßt wird, bietet sich als Ansatzpunkt der bei Abwesenheit von GABA am GAT-1 auftretende transiente Strom an. Nach Lu und Hilgemann [1999a] repräsentiert der

elektrogene Schritt den langsamsten Schritt innerhalb des Teilzyklus, welcher während des Auftretens transienter Ströme von dem GAT-1 durchlaufen wird. Welcher auch immer der ratenlimitierende Schritt innerhalb des Teilzyklus ist, so würde jedoch eine Veränderung desselben anhand einer in den Zeitkonstanten erkennbaren beeinträchtigten N-Glykosilierung der transienten Ströme auszumachen sein und könnte somit zumindest teilweise als Ursache für die reduzierte Transportrate herangezogen werden. Vergleicht man die gemessenen Zeitkonstanten jener transienten Ströme in Abbildung 15 erkennt man, daß die Werte für die N-Glykosilierungsmutanten doppelt so hoch sind, wie jene für den Wild-Typ und sich auf diese Weise signifikant voneinander unterscheiden. Man muß daraus konsequenterweise auf eine Beeinflussung des während transienter Ströme auftretenden Reaktionszyklus schließen. Die Werte für den Wild-Typ, welche bei 100 mM extrazellulärer Natriumkonzentration etwa 35 ms betragen, mögen zunächst seltsam anmuten, wenn sie mit solchen bereits in der Literatur beschriebenen verglichen werden. Bei gleicher extrazellulärer Konzentration und für den Sprung auf das gleiche Haltepotential (-30mV) liegen die Werte bei Mager *et al.* [1996] im Bereich von 250ms und bei Bossi *et al.* [2002] im Bereich von 100ms. Diese scheinbare Diskrepanz wird jedoch schnell erklärbar, wenn man die Bedingungen der Messungen vergleicht. Zunächst könnte man unter Umständen vermuten, daß der Grund in der Verschiedenheit der für die Messungen verwandten Zellsysteme liegt. Während nämlich für die hier vorliegende Arbeit an CHO-Zellen gemessen wurde, maßen Mager *et al.* und Bossi *et al.* an Oozyten des *Xenopus laevis*. Die Arbeit von Lu und Hilgemann lieferten indes den Hinweis auf den wahren Umstand. Auch letztere maßen zwar an Oozyten, jedoch vermochten sie es, die intrazelluläre Chloridkonzentration zu variieren und fanden heraus, daß die sich ergebenden Zeitkonstanten von jenen Chloridkonzentrationen stark abhängig sind. Bei entsprechender extrazellulärer Konzentration erhielten sie bei intrazellulärer Abwesenheit von Cl^- eine Zeitkonstante von etwa 12ms und bei 15mM Cl^- etwa 19ms. Obwohl diese Werte bei wesentlich negativeren Potentialen gemessen wurden als in den anderen Fällen, sind sie dennoch in der Lage, die im Falle der hier vorliegenden Arbeit gemessenen Werte von 35ms bei einer intrazellulären Chloridkonzentration von 4mM verständlich zu machen. Ein nicht unwichtiger zusätzlicher Aspekt, welcher bei einem solchen Vergleich mit Werten aus der Literatur sich Beachtung verschaffen muß, ist die Art und Weise, wie in den einzelnen Fällen die transienten Ströme ermittelt wurden: Im Fall von Lu und Hilgemann wie auch im Fall der hier vorgelegten Arbeit wurden zur Ermittlung jeweils Ströme herangezogen, welche sowohl in An- als auch in Abwesenheit von GABA gemessen wurden. Anhand dieser Vorgehensweise erhielt man transienten Ströme, welche durch einen Teilzyklus des GAT-1

mit all jenen Reaktionsschritten hervorgerufen werden, die nicht GABA benötigen. Mager *et al.* hingegen benutzen den GABA-Uptake-Inhibitor NO-05-711, um ihre transienten Ströme zu ermitteln, während Bossi *et al.* den Inhibitor SKF89976A verwandten. Diese Inhibitoren können bei Anwesenheit von GABA jedoch einen Transportzyklus zulassen, der gegenüber einem bei alleiniger Abwesenheit von GABA zustande kommenden verringert bzw. erweitert ist. Dieser Umstand mag ebenfalls eine Ursache für die oben geschilderte Diskrepanz darstellen und ist wahrscheinlich auch der Grund für die unterschiedlichen Werte in den Arbeiten von Mager *et al.* einerseits und Bossi *et al.* andererseits.

Es stellt sich bei der weiteren Suche nach einer Ursache für die reduzierte Transportrate nun die Frage, welche Reaktionsschritte der Teilzyklus überhaupt umfaßt. Eine eindeutige Antwort hierauf läßt sich bisher indes nicht geben. Es existieren lediglich auf Modellannahmen beruhende Indizien für eine Antwort, die im folgenden erläutert werden sollen:

Mager *et al.* [1998] nahmen an, daß zur Erklärung ihrer transienten Ströme das extrazelluläre Binden zweier Na^+ nötig sei. Hilgemann und Lu [1999], welche den in Abbildung 2 dargestellten Zyklus postulierten, wollten in der Okklusion des ersten Natriums und der damit einhergehenden Konformationsänderung den elektrogenen und für sie ratenlimitierenden Schritt sehen. Binda *et al.* [2002] betrachteten einen Diffusionsprozeß des Na^+ , welcher einer elektrogenen Konformationsänderung vorgelagert ist, als ratenlimitierend für den Eintransport, eine Auffassung, die Fesce *et al.* [2002] weitgehend teilten. Dies alles scheint darauf hinzudeuten, daß zumindest die Okklusion des ersten Na^+ und die darauf folgende Konformationsänderung innerhalb des Teilzyklus angesiedelt sind. Eine solche Annahme wird jedenfalls durch die Arbeit von Loo *et al.* [2000] untermauert, welche eine direkte Korrelation zwischen transportierten Natriumionen und der verschobenen Ladung gesehen haben.

Es läßt sich zusammenfassend sagen, daß eine beeinträchtigte N-Glykosilierung des GAT-1 einen ratenlimitierenden Schritt im Transportzyklus zu verlangsamen scheint, welcher mit der Natriumokklusion bzw. der darauffolgenden Konformationsänderung verknüpft ist. Bei der Natriumabhängigkeit der gemessenen Zeitkonstanten (vgl. Abbildung 15) hingegen lassen sich im Blick auf diese Abhängigkeit zwischen Wild-Typ und Mutanten keine Unterschiede erkennen. Hingegen fällt allgemein eine leichte Zunahme der Werte bei fallenden Konzentrationen auf. Diese Relation ist im Fall von Mager *et al.* [1996] sowie Bossi *et al.* [2002] bei entsprechendem Potential genau umgekehrt. Auch hier lassen sich die Unterschiede eventuell auf unterschiedliche intrazelluläre Chloridkonzentrationen

zurückführen, weil nach Lu und Hilgemann [1999a] extrazelluläres Na^+ mit intrazellulärem Cl^- konkurriert.

V.C.2. Ladungsverschiebung

Neben den Zeitkonstanten, mit Hilfe welcher sich die Kinetik der Ladungsverschiebung am GAT-1 in Abwesenheit von GABA erkunden läßt, ist die Potentialabhängigkeit sowie die Natriumkonzentrationsabhängigkeit ebendieser Ladungsverschiebungen im Hinblick auf Veränderungen durch eine beeinträchtigte N-Glykosilierung von Interesse. Wendet man seinen Blick den potentialabhängigen und mit Q_{\max} normierten Verläufen zu, wie sie in Abbildung 16 dargestellt sind, können ohne weiteres durch die Beeinträchtigung der N-Glykosilierung hervorgerufene Veränderungen ausgemacht werden, welche je nach vorherrschender extrazellulärer Natriumkonzentration unterschiedlich ausgeprägt sind. Erst die Anpassung dieser Verläufe mit einer aus der Fermi-Statistik gewonnene Gleichung erlaubt es, diese Veränderungen in Werte sinngebender Größen zu fassen. Die Mittelpunktspotentiale V_{mitte} dieser Verläufe in Abbildung 17 weisen jeweils für den Wild-Typ und für die Mutanten ein logarithmisches Verhalten der Natriumkonzentrationsabhängigkeit auf, wie es auch für $K_{1/2}$ -Werte einer Natriumbindung an ein Enzym im Sinne einer Hill-Kinetik zu erwarten wäre. So wurde schon in der frühen Arbeit von Mager *et al.* [1993] ein Vergleich dieser zwei Größen angestellt, und es wurde das natriumkonzentrationsabhängige Verhalten von V_{mitte} auf eine Interaktion des Natriums mit dem Transporter zurückgeführt. Betrachtet man die Verläufe in der hier vorliegenden Arbeit, mag es zunächst erstaunen, daß ihnen gegenüber die Verläufe von Mager *et al.* aber auch diejenigen aus der Arbeit von Bossi *et al.* [2002] bei gleicher extrazellulärer Konzentration in den negativen Bereich verschoben sind. Dieser Umstand läßt sich jedoch, genau wie im Falle der Zeitkonstanten, auf die verwendete intrazelluläre Chloridkonzentration zurückführen: Maßen nämlich sowohl Bossi *et al.* als auch Mager *et al.* an intakten Oozyten mit einer Chloridkonzentration des Zytosols von etwa 40mM, wurde für die hier vorgelegte Arbeit eine intrazelluläre Chloridkonzentration von 4mM verwendet. Lu und Hilgemann [1999a] konnten nun zeigen, das V_{mitte} stark von der intrazellulären Chloridkonzentration abhängig ist, was im übrigen den Verdacht einer Konkurrenz zwischen den Prozessen einer extrazellulärer Natriumbindung und denen einer intrazellulärer Chloridbindung an den GAT-1 erhärtet.

Ebenso wie die Publikationen von Liu *et al.* [1998] zeigen auch die Verläufe der hier vorgelegten Arbeit eine durch die beeinträchtigte N-Glykosilierung hervorgerufene

Verschiebung in negative Richtung und weisen somit auf eine verminderte Natriumsensitivität des Transporters. Vergewegenwärtigt man sich die Ergebnisse aus der Arbeit von Bossi *et al.*, welche eine extrazelluläre, durch den Ionenradius oder eine elektrostatische Wechselwirkung limitierte Eintrittskammer für die Coionen Na^+ und Cl^- am GAT-1-Transporter vermuten, liegt es nahe, den Grund für Veränderungen der hier aufgezeigten Verläufe für V_{mitte} auf einen geänderten Zugang des Natriums zum GAT-1 zurückführen zu wollen. Die bezeichneten Annahmen beruhen jedoch auf verschiedenen modellhaften Vorstellungen über Struktur und Funktionsweise des GAT-1, welche bei weitem noch nicht gesichert sind. Es sei hier also Vorsicht angebracht.

Im folgenden Abschnitt wenden wir uns der scheinbaren Valenz z_q zu. Die gemessenen z_q -Werte dieser Arbeit, welche sowohl für den Wild-Typ als auch für die N-Glykosilierungsmutanten bis auf eine Ausnahme zwischen 1 und 1,4 liegen, weichen stark von denen aus der Arbeit von Liu *et al.* ab, deren Werte bei 0,75 und darunter lagen. Welche Sachverhalte bei einem derart abweichenden Verhalten zum Tragen kamen, kann mit Hilfe der vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Auf das unterschiedliche Expressionssystem mögen diese Umstände jedenfalls nicht zurückgeführt werden, da Mager *et al.* einen Wert für z_q von 1.1 ermittelten, obwohl sie wie auch Liu *et al.* ihre GAT-1-Transporter in Oozyten exprimieren ließen. Auch die unterschiedliche Art und Weise der Auswertung transienter Ströme, welche zuvor als mögliche Ursache einer Abweichung von in der Literatur beschriebenen Werten mehrmals angeführt wurde, kann für eine Erklärung aus folgendem einfachen Grunde nicht dienlich sein: Die hier vorgelegte Arbeit wie die Arbeit von Liu *et al.* gehen nämlich in der Auswertung die gleichen Wege.

So bleibt uns nichts anderes, als die fraglichen Werte mit bedachter Vorsicht hinzunehmen. Eine entscheidende Gemeinsamkeit zwischen dieser und derjenigen Arbeit von Liu *et al.* läßt sich dennoch in den Ergebnissen für z_q erkennen: Beide Arbeiten können keine Natriumkonzentrationsabhängigkeit der scheinbaren Valenz z_q ausmachen, bis auf eine Ausnahme: In der vorgelegten Arbeit liegt im Falle der Mutanten DDN und bei 100mM Na^+ einen Wert von etwa 1,9 vor. Worauf dieser Befund zurückzuführen ist, bleibt unklar. Die Daten zeigen jedoch tendenziell in der Mehrheit bei beiden Arbeiten eine leichte, durch die beeinträchtigte N-Glykosilierung hervorgerufene Reduktion der scheinbaren Valenz und somit eventuell eine Reduktion der Anzahl der pro Transportzyklus verschobenen Ladungsträger. Jedoch gibt es für die Reduktion von z_q noch zahlreiche weitere Interpretationsmöglichkeiten, so daß hier Vorsicht angebracht ist. Ohnehin müssen die vor allem in der hier vorgelegten Arbeit festgestellten Unterschiede betr. z_q als zu gering

eingeschätzt werden, um die Reduktion in den Uptake-Messungen von Liu *et al.* sowie Cai *et al.* [2001] auch nur annähernd erklären zu können.

Als letzte Größe, welche sich aus den Verläufen der Ladungsverschiebung bestimmen ließ, ist die maximal verschiebbare Ladungsmenge Q_{\max} zu nennen. Aus dem Quotienten von den entsprechenden Werten Q_{\max} und z_q wurde die Anzahl der in der Membran befindlichen funktionellen GAT-1-Transporter ermittelt (vgl. Abbildung 19) und konnte dann dazu dienen, die gemessenen Größen auf den Wert eines Transportmoleküls zu normieren. Dieser Berechnung lag natürlich die Annahme zugrunde, daß alle an der Ladungsverschiebung in Abwesenheit von GABA teilhabenden Transportmoleküle auch dazu befähigt sind, einen vollständigen Transportzyklus zu durchlaufen.

Abschließend sei nochmals zusammengefaßt, daß sich die bei Liu *et al.* sowie Cai *et al.* beobachtete Reduktion der GABA-Aufnahme, welche durch eine beeinträchtigte N-Glykosilierung des GAT-1 hervorgerufen wurde, nicht (oder nur zu einem sehr geringen Teil) auf die veränderte scheinbare Valenz der während des Transportzyklus verschobenen Ladungsträger zurückführen läßt. Hingegen machen die Ergebnisse der Mittelpunktspotentiale einen Einfluß der N-Glykosilierung auf die Natrium-Transporter-Interaktion deutlich. Die Reduktion der GABA-Aufnahme könnte so wahrscheinlich teilweise durch eine Beeinträchtigung des Zugangs für Natrium an seine Bindungsstellen auf Grund einer beeinträchtigten N-Glykosilierung erklärt werden.

V.D. Abschluß und Ausblick

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit war es möglich, von Cai *et al.* [2001] sowie Liu *et al.* [1998] beobachtete Phänomene am GAT-1, welche durch eine beeinträchtigte N-Glykosilierung des GAT-1-Transporters hervorgerufen werden, auf Veränderungen im molekularen Transportprozeß des GAT-1 zurückzuführen. So konnten die Ergebnisse von Liu *et al.*, welche mit dem Expressionssystem der Oozyte des *Xenopus laevis* arbeiteten, zum großen Teil auch für das Expressionssystem der CHO-Zellen bestätigt werden. Dies betraf vor allem die Erkenntnis, daß sich die durch eine beeinträchtigte N-Glykosilierung hervorgerufene reduzierte GABA-Aufnahme bei den Flux-Messungen auf eine veränderte Transportrate des GAT-1 zurückführen ließen. Warum indes die Transportrate durch eine N-Glykosilierung beeinflusst war, konnte diese Arbeit auf eindruckliche Weise an den Zeitkonstanten sichtbar machen, welche hier mit der Konformationsänderung oder einem ihr vorgelagerten Natriumokklusionsschritt in Verbindung gebracht werden. Weiterhin erwies

sich die Natrium-Transporter-Interaktion als von der N-Glykosilierung beeinflusst. Fügt man diese Ergebnisse in das bisher vorherrschende Modell für den GAT-1 ein, so ergibt sich folgendes Bild: Eine beeinträchtigte N-Glykosilierung verändert sowohl den durch den Ionenradius bzw. eine elektrostatische Wechselwirkung limitierten Zugang zur Natriumbindung als auch den darauf folgenden ratenlimitierenden Schritt, welcher entweder die Okklusion des ersten Natriums oder die daran anschließende Konformationsänderung beinhaltet. Einen Hinweis dafür, daß die Zeitkonstanten tatsächlich den ratenlimitierenden Schritt betreffen, vermag ein Vergleich der Zeitkonstanten mit den Ratenkonstanten zu geben: Nach Abbildung 20 beträgt die Rate bei 150mM Na^+ $60e_0/s$. Unter der Annahme einer Stöchiometrie von einer Einheitsladung pro GABA-Molekül würden zum Durchlaufen des Transportzyklus somit etwa 17ms benötigt, im Falle von zwei Einheitsladungen pro GABA-Molekül wären dies etwa 33ms. Die Zeitkonstante der transienten Ströme beträgt bei entsprechender Natriumkonzentration etwa 32ms. Da sich sowohl die Werte für den Durchlauf als auch die der Zeitkonstante in einem ähnlichen Bereich bewegen, ist die Vermutung von Hilgemann und Lu [1999] gestärkt, daß die Zeitkonstanten der transienten Ströme einen ratenlimitierenden Schritt repräsentieren,.

Abschließend bleibt die bisherige Annahme zu bestätigen, daß die in der hier vorliegenden Arbeit zu Tage getretenen Effekte tatsächlich durch eine beeinträchtigte N-Glykosilierung des Transporters bewerkstelligt sind, oder aber durch eine per Mutation der N-Glykosilierungsstellen hervorgerufene Veränderung, welche jedoch nicht mit einem Fehlen von Oligosacchariden in Beziehung steht. Hiefür war es sinnvoll, die N-Glykosilierung des GAT-1 durch Methoden zu verhindern, welche der Mutation nicht bedürfen. Eine Möglichkeit eröffnete sich mit dem Mannosidaseinhibitor dMM. Bei mit dMM behandelten CHO-Zellen konnten Cai *et al.* zeigen, daß sich bei der Bestimmung des Molekulargewichtes sowie bei Uptake-Messungen die durch dMM veränderten GAT-1-Transporter genauso verhielten wie die N-Glykosilierungsmutanten. Auch in der hier vorgelegten Arbeit wurden die CHO-Zellen für die elektrophysiologischen Experimente mit dMM behandelt: Es zeigte sich bei Steady-State-Strömen durchaus eine Reduktion auf im Zuge der dMM-Behandlung (vgl. Abbildung 22) woraus geschlossen werden konnte, daß fehlende bzw. veränderte Oligosaccharide am GAT-1 für diese Reduktion verantwortlich waren. Jedoch waren die Ströme dieser Zellen zu klein, um weitere Analysen durchführen zu können und so die Ströme auf den einzelnen Transporter zurückzurechnen. Zudem wurden die CHO-Zellen durch die kostspielige dMM-Behandlung nur allzuoft zerstört. Dennoch geben die Ergebnisse Hinweise darauf, daß die in dieser Arbeit beobachteten Effekte auf das Fehlen von Oligosacchariden an den mutierten N-

Glykosilierungsstellen zurückzuführen sind. Jedoch zeigen vor allem die Transportraten (vgl. Abbildung 20) für die jeweilige Mutante bei 100mM ein unterschiedliches Verhalten, so daß sicherlich von einer mutationsbedingten Beeinflussung der Ergebnisse auf Grund struktureller, nicht durch N-Glykosilierung hervorgerufener Veränderung des GAT-1 gesprochen werden muß. Allerdings scheinen derartige Einflüsse keinen wesentlichen Anteil an den Effekten zu haben, stimmen doch die durch die jeweilige Mutante verursachten Effekte größtenteils überein.

Als Ausblick für weitere Forschung, den diese Arbeit eröffnet, bleibt festzuhalten: Die genauere Untersuchung der N-Glykosilierung unter Zuhilfenahme des Inhibitors dMM ist offensichtlich sinnvoll, um eventuell durch Mutation hervorgerufene störende strukturelle Veränderungen des GAT-1 zu umgehen. Desweiteren sollten N-Glykosilierungseinflüsse auf die Chlorid-Transporter-Interaktion hin untersucht werden, indem zum Beispiel auch der Umkehrtransport und die intrazelluläre Chloridbindung an den Transporter analysiert werden. Fluoreszenzmessungen an mit Fluoreszenzmarkern versehenen GAT-1-Proteinen, welche in der Lage sind Konformationsänderungen der Proteine sichtbar zu machen, könnten Aufschluß geben, ob lediglich die Na-Okklusion oder auch die Konformationsänderung von der N-Glykosilierung betroffen ist. Desweiteren könnten radioaktive GAT-1-Marker, wie zum Beispiel [³H]Tiagabin, Aufschluß über den bisher noch nicht eindeutig analysierten Effekt einer Einflußnahme der N-Glykosilierung auf die GAT-1-Expressionsrate funktioneller Transporter liefern. Es bleibt also im Hinblick auf die wissenschaftliche Durchdringung der N-Glykosilierung am GAT-1 noch ein Stück Weges zurückzulegen.

VI. Zusammenfassung

Die hier vorgelegte Arbeit hatte zur Aufgabe, funktionellen Einflüsse auf den Neurotransmittertransporter GAT-1 zu erhellen, welche durch eine N-Glykosilierung des Transportproteins hervorgerufen werden. Frühere Untersuchungen deuteten bereits darauf hin, daß der Glykosilierung der drei extrazellulär vorhandenen N-Glykosilierungsstellen des GAT-1 neben einer expressionellen Bedeutung auch eine funktionelle zukam. So zeigten sich bei Arbeiten anderer Gruppen, welche N-Glykosilierungsmutanten des GAT-1 verwendeten, um die Glykosilierung des Transportproteins zu beeinträchtigen, daß fehlende Oligosaccharide an den N-Glykosilierungsstellen des GAT-1 durchaus in eine Reduktion der GABA-Aufnahme in die Zellen mündete, was zumindest bei Oozyten des *Xenopus laevis* auf eine verminderte Transportrate zurückgeführt werden konnte. An CHO-Zellen konnte nun auf gleiche Weise eine Reduktion der GABA-Aufnahme beobachtet werden, und es galt, mit elektrophysiologischen Methoden die Ursachen dieser Reduktion zu erkunden. Die hier vorgelegte Arbeit vermochte nun bei CHO-Zellen, eine Verminderung der Transportrate als Ursache jener reduzierten GABA-Aufnahme auszumachen. Zu diesem Zwecke wurden die CHO-Zellen entweder mit der DNA des mGAT1 Wild-Typs (einem aus der Maus klonierten GAT-1-Transporter) oder mit der DNA von N-Glykosilierungsmutanten des mGAT1 transfiziert. Es fanden zwei verschiedene N-Glykosilierungsmutanten Verwendung, an denen jeweils zwei der drei N-Glykosilierungsstellen Asparagin durch Aspartat bzw. Glycin ersetzt wurden: (Asp176, Gly181, Asn184) bzw. DDN (Asp176, Asp181, Asn184). Wie indes die durch eine beeinträchtigte N-Glykosilierung verminderte Transportrate zustande kam, und wie sich eine entsprechende Erklärung in die bisherige Annahme den GAT-1 Reaktionszyklus betreffend einfügen und mit dessen Struktur verbinden ließe, vermochte die hier vorgelegte Arbeit zu einem großen Teil einsichtig zu machen. Zwei Phänomene konnten die Transportrate vermindern: Zunächst waren die Zeitkonstanten transienter Ströme, welche bei Abwesenheit von GABA auftreten, verlangsamt. Weil diese Ströme den ratenlimitierenden Schritt im Reaktionszyklus zu repräsentieren scheinen, mußte also jener Schritt, welcher die Okklusion des ersten Natriums oder die darauffolgende Konformationsänderung beinhaltet, verlangsamt sein. Im weiteren zeigten Analysen der bei den transienten Strömen auftretenden Ladungsverschiebungen, daß die Natrium-Transporter-Interaktion auf extrazellulärer Seite durch das Fehlen von Oligosacchariden an den N-Glykosilierungsstellen des GAT-1 beeinträchtigt war, wobei als Grund hierfür eine Verstärkung der dimensional bzw.

elektrogenen Schranke zu sehen ist, welche sich vor der Natriumbindungsstelle des GAT-1 befindet.

Eine Veränderung der Expressionsrate als tragende Ursache verminderter Transportraten bzw. reduzierter GABA-Aufnahmen konnte hingegen ausgeschlossen werden. Experimente mit dem N-Glykosilierungs-Inhibitor dMM sowie Vergleiche von Experimenten verschiedener Mutanten vermochten die oben beschriebenen Effekte hauptsächlich auf die durch die Mutationen fehlenden Oligosaccharide zurückzuführen und weniger auf andere durch die Mutation hervorgerufene strukturelle Änderungen des GAT-1-Proteins.

VII. Anhang

VII.A. Wichtige Abkürzungen:

DDN	eine von zwei verwendeten Glykosilierungsmutanten
DGN	eine von zwei verwendeten Glykosilierungsmutanten
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAT-1	GABA-Transporter Typ 1
mGAT1	GABA-Transporter Typ 1 aus der Spezies Maus
NNN	nicht-mutierter GABA-Transporter
Wild-Typ	nicht-mutierter GABA-Transporter

VII.B. Literaturverzeichnis

Bendahan A, Kanner BI. Identification of domains of a cloned rat brain GABA transporter which are not required for its functional expression. *FEBS Lett.* 1993; 318: 41-44.

Bennett ER, Kanner BI. The membrane topology of GAT-1, a ($\text{Na}^+ + \text{Cl}^-$)-coupled γ -aminobutyric acid transporter from rat brain. *J.Biol.Chem.* 1997; 272: 1203-1210.

Bennett ER, Su H, Kanner BI. Mutation of arginine 44 of GAT-1, a ($\text{Na}^+ + \text{Cl}^-$)-coupled γ -aminobutyric acid transporter from rat brain, impairs net flux but not exchange. *J.Biol.Chem.* 2000; 275: 34106-34113.

Binda F, Bossi E, Giovannardi S, Forlani G, Peres A. Temperature effects on the presteady-state and transport-associated currents of GABA cotransporter rGAT1. *FEBS Lett.* 2002; 512: 303-307.

Bismuth Y, Kavanaugh MP, Kanner BI. Tyrosine 140 of the γ -aminobutyric acid transporter GAT-1 plays a critical role in neurotransmitter recognition. *J.Biol.Chem.* 1997; 272: 16096-16102.

Borden LA. GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem.Int.* 1996; 29: 335-356.

Bossi E, Giovannardi S, Binda F, Forlani G, Peres A. Role of anion-cation interactions on the pre-steady-state currents of the rat Na^+/Cl^- -dependent GABA cotransporter rGAT1. *J.Physiol* 2002; 541: 343-350.

Cai GQ, Schwarz W, Becker A, Reutter W, Fan H. GABA uptake by GAT1 is affected by N-linked oligosaccharides. *Biophysical Journal* 2001; 80: 256A.

Cammack JN, Rakhilin SV, Schwartz EA. A GABA transporter operates asymmetrically and with variable stoichiometry. *Neuron* 1994; 13: 949-960.

Cammack JN, Schwartz EA. Channel behavior in a γ -aminobutyrate transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996; 93: 723-727.

Chen JG, Liu-Chen S, Rudnick G. Determination of external loop topology in the serotonin transporter by site-directed chemical labeling. *J.Biol.Chem.* 1998; 273: 12675-12681.

Cole KS. Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Arch.Sci.Physiol.* 1949; 3: 253-258.

Corey DP, Stevens CF. Science and Technology of Patch -Recording Electrodes. In: Sakmann B, Neher E, editors. *Single-Channel Recordings*. New York: Plenum Press, 1983: 53-60.

Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 1996; 173: 33-38.

Eckstein-Ludwig U, Fueta Y, Fei J, Schwarz W. The neuronal GABA transporter GAT1 as a target for action of antiepileptic drugs. In: Suketa Y, Carafoli E, Lazdunski M, Mikoshiba K, Okada Y, Wright EM, editors. *Control and Diseases of Sodium Dependent Transport Proteins and Ion Channels*. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2000: 373-6.

Elbein AD, Sanford BA, Ramsay MA, Pan YT. Effect of inhibitors on glycoprotein biosynthesis and bacterial adhesion. *Ciba Found.Symp.* 1981; 80: 270-287.

Fesce R, Giovannardi S, Binda F, Bossi E, Peres A. The relation between charge movement and transport-associated currents in the rat GABA cotransporter rGAT1. *J.Physiol* 2002; 545: 739-750.

Forlani G, Bossi E, Ghirardelli R, Giovannardi S, Binda F, Bonadiman L, Ielmini L, Peres A. Mutation K448E in the external loop 5 of rat GABA transporter rGAT1 induces pH sensitivity and alters substrate interactions. *J.Physiol* 2001; 536: 479-494.

Grossman TR, Nelson N. Differential effect of pH on sodium binding by the various GABA transporters expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* 2002; 527: 125-132.

Guastella J, Nelson N, Nelson H, Czyzyk L, Keynan S, Miedel MC, Davidson N, Lester HA, Kanner BI. Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* 1990; 249: 1303-1306.

Ham RG. Clonal Growth of Mammalian Cells in A Chemically Defined Synthetic Medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1965; 53: 288-&.

Hilgemann DW, Lu CC. GAT1 (GABA:Na⁺:Cl⁻) cotransport function. Database reconstruction with an alternating access model. *J.Gen.Physiol* 1999; 114: 459-475.

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Arch.Sci.Physiol.* 1949; 3: 129-150.

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. Measurements of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J.Physiol (Lond)* 1952; 116: 424-448.

Jaffe LA, Kado RT, Muncy L. Propagating potassium and chloride conductances during activation and fertilization of the egg of the frog, *Rana pipiens*. *J.Physiol* 1985; 368: 227-242.

Jursky F, Tamura S, Tamura A, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N. Structure, function and brain localization of neurotransmitter transporters. *J.Exp.Biol.* 1994; 196: 283-295.

Kanner BI. Active transport of gamma-aminobutyric acid by membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry* 1978; 17: 1207-1211.

Kanner BI, Bendahan A, Pantanowitz S, Su H. The number of amino acid residues in hydrophilic loops connecting transmembrane domains of the GABA transporter GAT-1 is critical for its function. *FEBS Lett.* 1994; 356: 191-194.

Kanner BI, Keynan S, Radian R. Structural and functional studies on the sodium- and chloride-coupled gamma-aminobutyric acid transporter: deglycosylation and limited proteolysis. *Biochemistry* 1989; 28: 3722-3728.

Kanner BI, Kifer L. Efflux of gamma-aminobutyric acid by synaptic plasma membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry* 1981; 20: 3354-3358.

Kao FT, Puck TT. Genetics of Somatic Mammalian Cells .7. Induction and Isolation of Nutritional Mutants in Chinese Hamster Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1968; 60: 1275-&.

Keshet GI, Bendahan A, Su H, Mager S, Lester HA, Kanner BI. Glutamate-101 is critical for the function of the sodium and chloride-coupled GABA transporter GAT-1. *FEBS Lett.* 1995; 371: 39-42.

Keynan S, Kanner BI. γ -Aminobutyric acid transport in reconstituted preparations from rat brain: coupled sodium and chloride fluxes. *Biochemistry* 1988; 27: 12-17.

Keynan S, Suh YJ, Kanner BI, Rudnick G. Expression of a cloned γ -aminobutyric acid transporter in mammalian cells. *Biochemistry* 1992; 31: 1974-1979.

Kleinberger-Doron N, Kanner BI. Identification of tryptophan residues critical for the function and targeting of the γ -aminobutyric acid transporter (subtype A). *J.Biol.Chem.* 1994; 269: 3063-3067.

Li M, Farley RA, Lester HA. An intermediate state of the γ -aminobutyric acid transporter GAT1 revealed by simultaneous voltage clamp and fluorescence. *J.Gen.Physiol* 2000; 115: 491-508.

Liu QR, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N. A family of genes encoding neurotransmitter transporters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; 89: 6639-6643.

Liu Y, Eckstein-Ludwig U, Fei J, Schwarz W. Effect of mutation of glycosylation sites on the Na^+ dependence of steady-state and transient currents generated by the neuronal GABA transporter. *Biochim.Biophys.Acta* 1998; 1415: 246-254.

Loo DD, Eskandari S, Boorer KJ, Sarkar HK, Wright EM. Role of Cl^- in electrogenic Na^+ -coupled cotransporters GAT1 and SGLT1. *J.Biol.Chem.* 2000; 275: 37414-37422.

Loo DD, Hirayama BA, Meinild AK, Chandy G, Zeuthen T, Wright EM. Passive water and ion transport by cotransporters. *J.Physiol* 1999; 518 (Pt 1): 195-202.

Lu CC, Hilgemann DW. GAT1 ($\text{GABA}:\text{Na}^+:\text{Cl}^-$) cotransport function. Kinetic studies in giant *Xenopus* oocyte membrane patches. *J.Gen.Physiol* 1999a; 114: 445-457.

- Lu CC, Hilgemann DW. GAT1 (GABA:Na⁺:Cl⁻) cotransport function. Steady state studies in giant *Xenopus* oocyte membrane patches. *J.Gen.Physiol* 1999b; 114: 429-444.
- Mabjeesh NJ, Frese M, Rauen T, Jeserich G, Kanner BI. Neuronal and glial gamma-aminobutyric acid⁺ transporters are distinct proteins. *FEBS Lett.* 1992; 299: 99-102.
- Mabjeesh NJ, Kanner BI. Neither amino nor carboxyl termini are required for function of the sodium- and chloride-coupled γ -aminobutyric acid transporter from rat brain. *J.Biol.Chem.* 1992; 267: 2563-2568.
- MacAulay N, Zeuthen T, Gether U. Conformational basis for the Li⁽⁺⁾-induced leak current in the rat gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter-1. *J.Physiol* 2002; 544: 447-458.
- Mager S, Cao Y, Lester HA. Measurement of transient currents from neurotransmitter transporters expressed in *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol.* 1998; 296: 551-566.
- Mager S, Kleinberger-Doron N, Keshet GI, Davidson N, Kanner BI, Lester HA. Ion binding and permeation at the GABA transporter GAT1. *J.Neurosci.* 1996; 16: 5405-5414.
- Mager S, Naeve J, Quick M, Labarca C, Davidson N, Lester HA. Steady states, charge movements, and rates for a cloned GABA transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 1993; 10: 177-188.
- Marmont G. Studies on the axon membrane I. A new method. *J.Cell.Comp.Physiol.* 1949; 34: 351-382.
- Morara S, Brecha NC, Marcotti W, Provini L, Rosina A. Neuronal and glial localization of the GABA transporter GAT-1 in the cerebellar cortex. *Neuroreport* 1996; 7: 2993-2996.
- Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976; 260: 799-802.
- Neher E, Sakmann B. *Single-Channel Recording*. New York: Plenum Press, 1995.
- Nelson H, Mandiyan S, Nelson N. Cloning of the human brain GABA transporter. *FEBS Lett.* 1990; 269: 181-184.
- Palacín M, Estévez R, Bertran J, Zorzano A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev.* 1998; 78: 969-1054.
- Pantanowitz S, Bendahan A, Kanner BI. Only one of the charged amino acids located in the transmembrane alpha-helices of the gamma-aminobutyric acid transporter (subtype A) is essential for its activity. *J.Biol.Chem.* 1993; 268: 3222-3225.
- Parodi AJ. Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem.J.* 2000; 348 Pt 1: 1-13.
- Porwoll S, Loch N, Kannicht C, Nuck R, Grunow D, Reutter W, Tauber R. Cell surface glycoproteins undergo postbiosynthetic modification of their N-glycans by stepwise demannosylation. *J.Biol.Chem.* 1998; 273: 1075-1085.

Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A. Genetics of Somatic Mammalian Cells .3. Long-Term Cultivation of Euploid Cells from Human and Animal Subjects. *Journal of Experimental Medicine* 1958; 108: 945-&.

Radian R, Bendahan A, Kanner BI. Purification and identification of the functional sodium- and chloride-coupled gamma-aminobutyric acid transport glycoprotein from rat brain. *J.Biol.Chem.* 1986; 261: 15437-15441.

Radian R, Kanner BI. Stoichiometry of sodium- and chloride-coupled gamma-aminobutyric acid transport by synaptic plasma membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry* 1983; 22: 1236-1241.

Radian R, Kanner BI. Reconstitution and purification of the sodium- and chloride-coupled gamma-aminobutyric acid transporter from rat brain. *J.Biol.Chem.* 1985; 260: 11859-11865.

Roth J. Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. *Chem.Rev.* 2002; 102: 285-303.

Schwarz W, Rettinger J. *Foundations of Electrophysiology*. Aachen: Shaker Verlag, 2000.

Sigworth FJ. Electronic Design of the Patch Clamp. In: Neher E, Sakmann B, editors. *Single-Channel Recording*. New York: Plenum Press, 1995: 95-126.

Sitte HH, Singer EA, Scholze P. Bi-directional transport of GABA in human embryonic kidney (HEK-293) cells stably expressing the rat GABA transporter GAT-1. *Br.J.Pharmacol.* 2002; 135: 93-102.

Smith TG, Lecar H, Redman S.J., Gage PW. *Voltage and Patch Clamping With Microelectrodes*. Bethesda, Maryland: American Physiological Society, 1985.

Swan M, Najlerahim A, Watson RE, Bennett JP. Distribution of mRNA for the GABA transporter GAT-1 in the rat brain: evidence that GABA uptake is not limited to presynaptic neurons. *J.Anat.* 1994; 185 (Pt 2): 315-323.

Tamura S, Nelson H, Tamura A, Nelson N. Short external loops as potential substrate binding site of γ -aminobutyric acid transporters. *J.Biol.Chem.* 1995; 270: 28712-28715.

Uhl GR. Neurotransmitter transporters (plus): a promising new gene family. *Trends Neurosci.* 1992; 15: 265-268.

Vallee F, Karaveg K, Herscovics A, Moremen KW, Howell PL. Structural basis for catalysis and inhibition of N-glycan processing class I alpha 1,2-mannosidases. *J.Biol.Chem.* 2000; 275: 41287-41298.

Wipf D, Ludewig U, Tegeder M, Rentsch D, Koch W, Frommer WB. Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends Biochem.Sci.* 2002; 27: 139-147.

Yu N, Cao Y, Mager S, Lester HA. Topological localization of cysteine 74 in the GABA transporter, GAT1, and its importance in ion binding and permeation. *FEBS Lett.* 1998; 426: 174-178.

VII.C. Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienname: Salonikidis
 Vornamen: Petrus Stephan
 Geburtsdatum: 27. März 1973
 Geburtsort: Masdjed-Soleyman / Iran
 Familienstand: unverheiratet
 Nationalität: deutsch



Ausbildung

- | | |
|----------------|---|
| seit Ende 2002 | wissenschaftliche Position am Center for Molekular Physiology of the Brain (CMPB) in Göttingen |
| seit 1999 | Doktorand im Fachbereich Physik an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main. Promotionsarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysik Frankfurt, Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Schwarz, mit einem 4-monatigem Aufenthalt in China, Institute of Cell Biology, CAS Shanghai /China, Thema: Elektrophysiologische Untersuchungen über die funktionelle Bedeutung der N-Glykosylierung des GABA-Transportproteins besonders in Bezug auf die Kinetik der Natrium-Transporter-Interaktion.
Gutachter: Prof. Dr. W. Schwarz / Prof. Dr. D. Schubert |
| 1999 | Diplom in Physik (Biophysik als Spezialgebiet und Geophysik als Wahlfach) an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main |
| 1998-99 | Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysik Frankfurt, Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Schwarz, Thema: Elektrophysiologische Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit stationärer und transientser Pumpenströme der Na/K-ATPase
Gutachter: Prof. Dr. D. Schubert / Prof. Dr. W. Schwarz |
| 1992 | Beginn des Diplomstudienganges mit Physik als Haupt- und Geophysik als Nebenfach an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main |
| 1992 | Abitur am Albert-Einstein-Gymnasium in Schwalbach am Taunus |

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

- | | |
|------|---|
| 2001 | Effects of Traditional Chinese Medicines Used in the Treatment of Epilepsy on Transporters for GABA and Glutamate Uptake, Eur. J. Physiol.(2001) 441 (Suppl. 6):R241. |
|------|---|

(Fortsetzung siehe folgende Seite)

- 2000 Na/K-ATPase and Related ATPases., Bucheditoren: Taniguchi K., Kaya S., Seite 471, Elsevier Science B.V., 2000, Amsterdam, Niederlande
- 2000 Extracellular pH Modulates Kinetics of the Na(+),K(+)-ATPase
Biochim Biophys Acta. 2000 Dez. 20;1509(1-2):496-504.

VII.D. Danksagung

An Herrn Prof. Dr. W. Schwarz möchte ich meinen größten Dank für die engagierte Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit aussprechen sowie für die Möglichkeit, in seinem Labor die Untersuchungen durchführen zu können..

Herrn Prof. Dr. D. Schubert möchte ich für die Begutachtung der vorliegenden Arbeit recht herzlich danken.

Christoph Grewer danke ich, daß er sich als Vertrauensperson zur Verfügung stellte und für manchen guten Rat.

Herrn Dr. Nagel danke ich für die Möglichkeit, seinen Zellkulturraum nutzen zu dürfen.

Ana Bicho und Dr. Natalie Watzke möchte ich für die Einführung in die Methoden der Zellkultur und für große Hilfe bei Zelltransfektionen danken.

Heike Biehl möchte ich für die Unterstützung bei der Zellkultur und der DNA-Präparation danken, Heike Fotis und Eva-Maria Gärtner für die Flux-Messungen und allen drei zusammen für die vielen weiteren Hilfestellungen.

Thomas Fucke, Stephan Krause, Dr. Jürgen Rettinger, Andreas Spielmann und Michael Stolz möchte ich für die großartige wissenschaftliche Zusammenarbeit und die vielen schönen Unterhaltungen und gemeinsamen Unternehmungen danken.

Unserer ganzen Arbeitsgruppe und unseren vielen Gästen gilt mein aufrichtiger Dank für die anregenden Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.